

Recherche d'enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine chez Arabidopsis thaliana et étude préliminaire de mutants à teneur réduite en carnitine

Yingjuan Zhao

▶ **To cite this version:**

Yingjuan Zhao. Recherche d'enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine chez Arabidopsis thaliana et étude préliminaire de mutants à teneur réduite en carnitine. Biotechnologies. Université de Technologie de Compiègne, 2014. Français. NNT : 2014COMP2136 . tel-01077965

HAL Id: tel-01077965

https://theses.hal.science/tel-01077965

Submitted on 27 Oct 2014

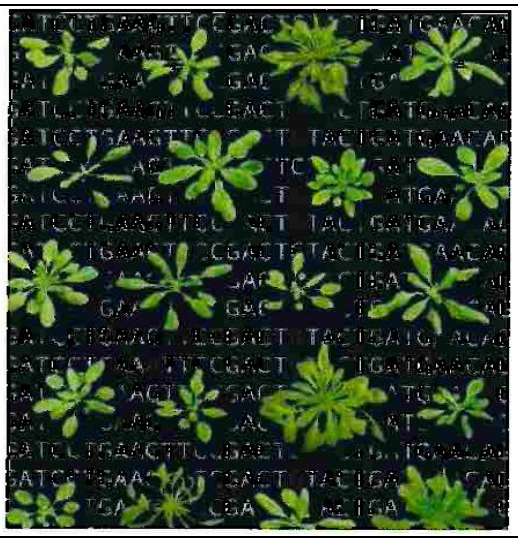
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Par **Yingjuan ZHAO**

Recherche d'enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine chez Arabidopsis thaliana et étude préliminaire de mutants à teneur réduite en carnitine

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 18 mars 2014
Spécialité : Biotechnologie

D2136

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITE de TECHNOLOGIE de COMPIEGNE

Unité de Recherche FRE CNRS 3580

Laboratoire Génie Enzymatique et Cellulaire

Par

Yingjuan ZHAO

Recherche d'enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine chez Arabidopsis thaliana *et étude préliminaire de mutants à teneur réduite en carnitine*

Soutenance le 18 mars 2014

Devant le jury composé de:

Solange Moréra, Dr.	Laboratoire d'enzymologie et biochimie structurales, CNRS Gif s/Yvette	Rapporteur
Pierre Carol, Pr.	Université Pierre et Marie Curie, Paris VI	Rapporteur
Pascal Ratet, Dr.	Institut des Sciences du végétal, CNRS Gif s/Yvette	Examinateur
Bérangère Bihan-Avalle, Pr.	Université de Technologie de Compiègne	Président
Sonia Rippa, Dr.	Université de Technologie de Compiègne	Diretrice de thèse
Yolande Perrin, Dr.	Université de Technologie de Compiègne	Diretrice de these

Remerciements

*Je tiens à remercier vivement le **Pr Daniel Thomas,** le **Pr Pierre Carol,** le **Dr Solange Moréra** et le **Dr Pascal Ratet** d'avoir accepté de faire partie de la commission d'examen de cette thèse.*

*Je suis particulièrement reconnaissante envers le **Pr Karsten Haupt** pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire Génie Enzymatique et Cellulaire (FRE CNRS 3580) à l'Université de Technologie de Compiègne. De même, je remercie le **Dr A. Friboulet** en sa qualité de responsable de l'équipe « Biomimétisme et Approche Intégrée des Fonctions » et le **Dr Brigitte Thomasset** responsable du thème « Métabolisme intégré des plantes oléagineuses » au sein desquels a été réalisé ce travail.*

*Je remercie le **Dr Yolande Perrin** pour m'avoir accueillie dans l'équipe « Carnitine ». Je remercie vivement le **Dr Sonia Rippa** et le **Dr Yolande Perrin**, mes directrices de thèse, pour la qualité de leur enseignement, pour leur patience et pour m'avoir aidée à traverser cette étape avec force et soutien et de m'avoir ouvert la porte qui conduit au monde de la recherche. Aussi, je les remercie grandement pour le temps qu'elles ont consacré et l'énergie qu'elles ont mis pour la correction de ce manuscrit.*

*Je tiens à remercier chaleureusement **Phuong Jean Nguyen**, pour son aide précieuse sur certaines analyses qui sans lui n'auraient pu se faire. D'un point de vue plus personnel, ces années de thèse dans la même équipe font de lui une personne que je n'oublierai pas.*

*Je remercie également les stagiaires **Olefongo Dagnogo** et **Marine Morel** pour leur participation pendant ces travaux de thèse. Je remercie beaucoup **Franck Merlier** pour ses précieux conseils techniques et son aide sur les analyses de spectrométrie de masse. Je remercie **Pascal Boulnois** et **Valérie Santoni** qui m'ont apporté une aide précieuse ainsi que toute l'équipe du laboratoire GEC pour leur assistance et leur efficacité en toutes circonstances.*

*Je remercie les **Dr Laurent Gutierrez** et **Stéphanie Guénin** de l'Université de Picardie Jules Verne pour m'avoir accueillie au sein du Centre de Ressources Régional en Biologie Moléculaire.*

*Je remercie le **Dr. Ben Distel**, de l'Université d'Amsterdam, pour l'envoi des mutants de levure et son assistance.*

Je remercie Thierry pour m'avoir permis de perfectionner mon français et de m'avoir accompagnée pendant les moments joyeux ou difficiles. Un grand merci à tous les étudiants croisés au laboratoire durant cette thèse, pour les très bons moments passés après le travail.

Je remercie également Xun Wang, Yao Li, Yang Xia, Zhenzhou Zhu, Xuan Zhang, Jianquan Luo, Xuqu Hu et tous mes autres amis en France.

J'ai peut-être oublié, au moment de rédiger cette page, certaines personnes qui ont contribué à ce travail d'un point de vue humain ou technique, j'espère qu'elles me pardonnent.

Bien évidemment, merci infiniment à ma famille, trop éloignée mais toujours là. J'exprime évidemment et de toutes mes forces ma gratitude et mon amour à mes parents sans qui rien de tout cela n'aurait été possible.

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	Acide Aminé
ABA	Acide Abscissique
ABC	ATP-Binding Cassette
ADN (DNA)	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADN-T	ADN de transfert
AG	Acide Gras
amiRNA	Artificial microRNA
ARN (RNA)	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
BBD	Butyrobétaïne Dioxygénase
BET	Bromure d'Ethidium
CRC et CACT	Carnitine Acyl-Carnitine Translocase
CAT	Carnitine Acétyl-Transférase
CIT	Citrate synthase péroxysomale
CO_2	Dioxyde de Carbone
CoA	Coenzyme A
CoASH	Coenzyme A réduit
COT	Carnitine Octanoyl-Transférase
CPT	Carnitine Palmitoyl-Transférase
CTP	Cytidine Triphosphate
DAG	Diacylglycérol
$dCT^{32}P$	Désoxy Cytosine Tri-^{32}phosphate
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DLU	Digital light units
dNTP	Désoxyribonucléotide Triphosphate
DO	Densité Optique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique
et al.	*et alii*, et autres
Fwd	Forward
g	gravitation
GFP	Green Fluorescence Protéine
HEPES	4-(2-Hydroxyéthyl)-1-Pipérazineéthanesulfonique
His	Histidine
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HTML	3-Hydroxy-6-*N*-Triméthyllysine
HTMLA	3-Hydroxy-6-*N*-Triméthyllysine Aldolase
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani Milieu
LC-ESI-MS/MS	Liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry

LCFA	Long Chain Fatty Acid
LiAc	Acétate de Lithium
m/z	masse/charge
mb	membrane
MCFA	Moyen Chain Fatty Acid
MF	Matière Fraîche
MOPS	acide 3-[*N*-Morpholino] Propanesulfonique
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Matière Sèche
M&S	Murashige et Skoog
NaAc	Acétate de Sodium
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
NTE	NaCl, Tris-HCl, EDTA
OCTN	Organic Cation Transporter
pb	paire de bases
PCR	Polymerisation Chain Reaction
PDH	Pyruvate Déshydrogénase
PE	Phosphatidyléthanolamine
PEG	Polyéthylène Glycol
PG	Phosphatidylglycérol
γ-BB	γ-butyrobétaïne
RE	Réticulum Endoplasmique
REB	RNA Extraction Buffer
RNase	Ribonucléase
rpm	revolutions per minute
Rev	Reverse
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerisation Chain Réaction
SAB	Sérum Albumine Bovine
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SHMT	Sérine Hydroxyméthyltransférases
TAE	Tris-Acétate EDTA
TAG	Triacylglycérol
TCA	Acide Tricarboxylique
THA	Thréonine Aldolases
TMABA	4-*N*-Triméthylaminobutyraldéhyde
TMABADH	4-*N*-Triméthylaminobutyraldéhyde Déshydrogénase
TML	6-*N*-Triméthyllysine
TMLD	6-*N*-Triméthyllysine Dioxygénase
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
Tween-80	Polysorbate 80
TE	Tris-EDTA
U	Unité
Ura	Uracile
v	volume

VLCFA	Very Long Chain Fatty Acid
YNB	Yeast Nitrogen Base
YPD	Yeast Peptone Dextrose
Δ	délétion d’un gene

SOMMAIRE

INTRODUCTION AU SUJET DE THESE **7**

CHAPITRE I - INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE **8**

1. La carnitine et les fonctions biologiques de la carnitine **8**
1.1 Données générales sur la carnitine **8**
1.2 Pathologies humaines associées à la carnitine **9**
1.3 Fonctions de la carnitine chez les animaux et les micro-organismes **9**
1.3.1 Rôles dans le métabolisme énergétique **9**
1.3.1.1 Transport intracellulaire des acides gras **9**
1.3.1.2 Maintien du ratio acétyl-CoA/CoA **13**
1.3.2 Fonction de protection cellulaire **14**
1.3.2.1 Action anti-oxydante **14**
1.3.2.2 Détoxification **15**
1.3.2.3 Recyclage lipidique **15**
1.3.2.4 Modulation de l'activité de protéines **16**
1.3.3 Rôle d'osmolyte **16**
1.4 Rôle de la carnitine chez les plantes **16**
1.4.1 Présence de la carnitine et d'acyl-carnitines chez les plantes **16**
1.4.2 Activités carnitine acyl-transférases chez les végétaux **17**
1.4.3 Transport de la carnitine chez les plantes **18**
1.4.4 Rôle de la carnitine dans le métabolisme lipidique chez les plantes **19**
1.4.4.1 Implication de la carnitine dans le catabolisme des réserves lipidiques **19**
1.4.4.2 Implication de la carnitine dans la synthèse des lipides **21**
1.4.5 Rôle de la carnitine dans la tolérance au stress biotique chez les plantes **22**
2. Biosynthèse de la carnitine **22**
2.1 Biosynthèse de la carnitine chez l'animal **22**
2.1.1 Voie de biosynthèse de la carnitine **22**
2.1.2 TMLD **23**
2.1.3 HTMLA **24**
2.1.4 TMABADH **25**
2.1.5 BBD **26**
2.1.6 Homéostasie de la carnitine chez l'homme **27**

2.2 Biosynthèse de la carnitine chez les levures 28
2.2.1 TMLD et BBD 28
2.2.2 HTMLA 28
2.2.3 TMABADH 29
2.3 Etat des connaissances sur la biosynthèse de la carnitine chez les plantes 29
3. Démarche scientifique 31

CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES 33

1. Matériel 33
1.1 Bactéries 33
1.1.1 *Escherichia coli* 33
1.1.2 *Agrobacterium tumefaciens* 33
1.2 Levures *Candida albicans* 33
1.3 Matériel végétal 34
1.4 Vecteurs de clonage d'ADN 34
1.4.1 Description des plasmides 34
1.4.2 Antibiotiques sélectifs 38
2. Technique préparatives 38
2.1 Culture et transformation des organismes 38
2.1.1 Culture et transformation des bactéries *E. coli* 38
2.1.2 Culture et transformation des bactéries *A. tumefaciens* 39
2.1.3 Culture et transformation des levures 40
2.1.4 Culture et transformation des plantes 41
2.1.4.1 Culture des plantes *in vitro* **41**
2.1.4.2 Culture des plantes en serre **41**
2.1.4.3 Transformation des plantes **41**
2.2 Techniques d'extraction d'acides nucléiques 42
2.2.1 Extraction d'ADN plasmidique 42
2.2.2 Extraction rapide d'ADN génomique de plantes 42
2.2.3 Extraction d'ARN totaux de plantes 42
2.2.3.1 Extraction classique d'ARN totaux de plantes **42**
2.2.3.2 Extraction rapide d'ARN totaux de plantes **43**
2.3 Techniques d'amplification par PCR 43
2.3.1 Amorces utilisées pour les réactions PCR 43
2.3.2 PCR de génotypage 45
2.3.3 Amplification par PCR de gènes en vue de constructions plasmidiques 45

2.3.4 Amplification par PCR de gènes en vue de la réalisation de sondes pour les Northern Blots 45
2.3.5 RT-PCR 46
2.3.6 Amplification des précurseurs d'*amiRNA* par PCR 46
2.4 Réactions de ligation 47
2.5 Réactions de digestion enzymatique 47
2.6 Extraction des carnitines et de la γ-BB 48
2.6.1 Extraction de la carnitine libre, des acyl-carnitines et de la γ-BB 48
2.6.2 Extraction de la carnitine estérifiée 48
3. Techniques analytiques 49
3.1 Analyse par PCR quantitative en temps réel (Real-time qPCR) 49
3.2 Techniques d'analyse d'acides nucléiques 50
3.2.1 Electrophorèse sur gel d'agarose 50
3.2.2 Analyse de l'expression des gènes par Northern Blot 50
3.2.2.1 Séparation des ARN par électrophorèse et transfert sur membrane **50**
3.2.2.2 Préparation de la sonde radioactive, hybridation et lavages de la membrane **51**
3.2.2.3 Détection du signal **51**
3.2.2.4 Quantification de l'expression des gènes **52**
3.3 Analyse et quantification des carnitines et γ-butyrobétaïne (γ-BB) par LC-ESI-MS/MS 52

Chapitre III – RECHERCHE D'ENZYMES CANDIDATES POTENTIELLEMENT IMPLIQUEES DANS LA SYNTHESE DE LA CARNITINE CHEZ *A. THALIANA* 56

1. Recherche bioinformatique 56
1.1 Recherche de candidats HTMLA (3-hydroxy-6-*N*-triméthyllysine aldolase) chez Arabidopsis 56
1.2 Recherche de candidats TMABADH (4-*N*-trimethylaminobutyraldeyde déshydrogénase) chez Arabidopsis 58
2. Données bibliographiques sur les protéines d'Arabidopsis homologues aux protéines humaines et de levure impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine 59
2.1 Protéines homologues aux HTMLA chez Arabidopsis 60
2.1.1 Protéines SHMT 60
2.1.2 Protéines THA 60
2.2 Protéines homologues aux TMABADH chez Arabidopsis 61

2.2.1 Protéines ALDH2 61
2.2.2 Protéines ALDH10 62
3. Mutants avérés ou probables des protéines d'Arabidopsis homologues aux protéines humaines et de levure impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine 63
4. Conclusion 65

Chapitre IV – ETUDE DE L'IMPLICATION DES ENZYMES D'ARABIDOPSIS HOMOLOGUES AUX HTMLA DANS LA SYNTHESE DE CARNITINE 66

1. Protéines SHMT 66
1.1 Etude du mutant *shmt1-1* 67
1.1.1 Analyse de la teneur en γ-BB 67
1.1.2 Analyse de la teneur en carnitine 68
1.1.3 Analyse de la teneur en acyl-carnitines 69
1.1.4 Etude du développement précoce du mutant *shmt1-1* 69
1.2 Recherche d'un mutant perte de fonction de *SHMT2* 71
1.3 Recherche d'un mutant perte de fonction de *SHMT3* 72
1.4 Conclusion 73
2. Protéines THA 73
2.1 Etude du mutant *tha1-1* 73
2.1.1 Analyse de la teneur en γ-BB 74
2.1.2 Analyse de la teneur en carnitine 74
2.1.3 Analyse de la teneur en acyl-carnitines 75
2.2 Etude des mutants perte de fonction de THA2 76
2.2.1 Effet d'un apport exogène de carnitine sur la germination et le développement de plantules hétérozygotes 77
2.2.2 Dosage de la carnitine chez les mutants *tha2-1* et *tha2-2* 78
2.3 Conclusion 79
3. Discussion et perspectives 79

Chapitre V – ETUDE DE L'IMPLICATION DES ENZYMES D'ARABIDOPSIS HOMOLOGUES AUX TMABADH DANS LA SYNTHESE DE CARNITINE 83

1. Protéines ALDH2 83

1.1 Etude des mutants pertes de fonction des protéines ALDH2B4, ALDH2B7 et ALDH2C4 **83**
1.2 Conclusion **85**
2. Protéines ALDH10 **85**
2.1 Etude du mutant *KO8-2* **86**
2.1.1 Analyse de la teneur en γ-BB **86**
2.1.2 Analyse de la teneur en carnitine **87**
2.1.3 Analyse de la teneur en acyl-carnitines **88**
2.1.4 Analyse de la teneur en glycine bétaïne **90**
2.1.5 Etude du développement précoce du mutant *K08-2* **90**
2.1.6 Conclusion **91**
2.2 Protéine ALDH10A9 **91**
2.2.1 Recherche d'un mutant perte de fonction du gène *ALDH10A9* **91**
2.2.2 Approche de mutagénèse par expression d'un micro-ARN artificiel ciblant le gène *ALDH10A9* **92**
2.2.2.1 Construction *amiRNA1* génération T1 **93**
2.2.2.2 Construction *amiRNA2* génération T1 **102**
2.2.2.3 Conclusion sur la génération T1 **103**
2.2.2.4 Génération T2 **104**
2.2.2.5 Génération T3 **107**
2.2.2.6 Conclusion **112**
3. Discussion et perspectives **112**

Chapitre VI – ETUDES PRELIMINAIRES DE LA FONCTION DES GENES *ALDH10A8* ET *ALDH10A9* CHEZ ARABIDOPSIS **117**

1. Etude de la capacité de complémentation d'un mutant de levure par les enzymes ALDH10A8 et ALDH10A9 **117**
1.1 Préparation des clones de levure **118**
1.2 Expérience de complémentation **119**
1.3 Conclusion **121**
2. Etude de l'expression des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* chez Arabidopsis **121**
2.1 Données bioinformatiques **122**
2.1.1 Expression du gène *ALDH10A8* **122**
2.1.2 Expression du gène *ALDH10A9* **123**
2.1.3 Comparaison de l'expression des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* **124**
2.1.4 Conclusion **125**

2.2 Etude de l'expression des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* dans les plantes d'Arabidopsis **125**
2.2.1 Etude de l'expression des gènes au cours de la croissance de jeunes plantules **125**
2.2.2 Etude de l'expression des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* dans les différents organes de plantes **128**
2.2.3 Conclusion **129**
2.3 Analyse de l'expression des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* chez les mutants **129**
2.3.1 Analyse de l'expression du gène *ALDH10A9* chez *K08-2* **129**
2.3.2 Analyse de l'expression du gène *ALDH10A8* chez les mutants *KD9-1* et *KD9-2* **130**
3. Discussion et perspectives **131**

CONCLUSION GENERAL E ET PERSPECTIVES **134**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **140**

INTRODUCTION AU SUJET DE THESE

Un des thèmes de recherche de l'équipe *Biocatalyse et Approche Intégrée des Fonctions* du laboratoire *Génie Enzymatique et Cellulaire* (FRE CNRS 3580) dans lequel a été réalisé ce travail de thèse est l'étude du métabolisme lipidique des plantes oléagineuses dans une optique finalisée de valorisation industrielle des huiles végétales. Les tentatives de la communauté scientifique travaillant sur l'accumulation d'acides gras modifiés dans ces huiles ont jusqu'à présent été infructueuses. Ceci a entraîné une prise de conscience de la nécessité de mieux comprendre le métabolisme des acides gras et lipides végétaux pour contourner les points de blocages rencontrés. La complexité du métabolisme lipidique notamment dans sa compartimentation cellulaire nécessite de déterminer les modalités de trafic intracellulaire des acides gras.

La carnitine est un acide aminé non protéinogène appartenant à la famille des bétaïnes dont la fonction biologique a fait l'objet de nombreuses études chez les animaux et les microorganismes. Son rôle principal est de participer au trafic intracellulaire des acides gras entre différents organites intracellulaires lors de la synthèse ou de la dégradation des lipides (Owen *et al.* 1997; Fraser et Zammit, 1999). Elle est également impliquée dans la tolérance aux conditions environnementales défavorables (Beckman et Ames, 1998; Franken *et al*., 2008). Chez les végétaux, bien que des données mettent en évidence une implication de la carnitine dans le métabolisme lipidique des plantes et également dans la tolérance au stress biotique (Wood *et al.*, 1992; Bourdin *et al.*, 2007; Charrier *et al.*, 2012) le rôle de cet acide aminé est encore mal défini.

La compréhension du rôle biologique de la carnitine chez la plante passe par une acquisition de connaissances sur les acteurs enzymatiques impliqués dans son métabolisme et associés à son activité. Aussi ce travail a poursuivi un double objectif: d'une part l'identification de protéines impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine et l'obtention de mutants de ces protéines susceptibles de présenter des teneurs significativement réduites en carnitine qui seront un outil d'analyse primordial pour avancer dans la connaissance sur les modalités d'implication de la carnitine dans la physiologie des plantes.

La démarche scientifique suivie dans ce travail de thèse sera présentée p 31 après avoir explicité l'ensemble des connaissances disponibles sur les fonctions de la carnitine et sur sa voie de biosynthèse essentiellement chez les animaux et microorganismes mais aussi chez les plantes.

CHAPITRE I - INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. La carnitine et les fonctions biologiques de la carnitine

1.1 Données générales sur la carnitine

La carnitine, de formule brute $C_7H_{15}NO_3$, a été isolée en 1905 par Kutscher, Gulewitsch et Krimberg à partir d'extraits de muscle, d'où son nom dérivé du latin *caro* ou *carnis* (chair). Sa structure, une triméthyl betaïne de L-Threonine (**Figure 1**), a été déterminée en 1927 (Tomita et Sendju, 1927) mais son importance métabolique n'a été mise en évidence que 40 ans après sa découverte. Elle a en effet été identifiée comme un facteur de croissance essentiel pour le ver de farine *Tenebrio molitor*, nommé vitamine BT (Fraenkel *et al.*, 1948). Lors de carence en carnitine, les larves de ce ver accumulaient en effet une quantité excessive de graisse dans leurs cellules en mourant toutefois d'un manque de nutriment. Ceci a suggéré un rôle de la carnitine dans le catabolisme des graisses, vérifié en 1955 par Fritiz, qui a montré que l'ajout de carnitine à des extraits de muscle stimulait l'oxydation du palmitate. Ces travaux ont conduit à la découverte de la fonction de transporteur mitochondrial de la carnitine et son rôle important dans la combustion des acides gras libres (Bremer, 1962[1]). Ce rôle majeur, ainsi que d'autres fonctions biologiques découvertes depuis sont décrits dans ce chapitre.

La carnitine est un acide aminé non protéinogène dont la forme biologiquement active est de configuration stérique L (Bremer, 1962[1]). Elle contient une fonction ammonium quaternaire ainsi qu'une fonction hydroxyle qui lui permet de s'estérifier avec les acides gras (AG) pour former des acyl-carnitines.

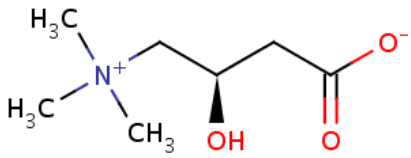


Figure 1: Formule chimique de la carnitine.

La carnitine est un composé ubiquitaire, présent dans tous les organes de mammifères et de nombreux animaux inférieurs, ainsi que chez de nombreux micro-organismes et végétaux (Rebouche, 1992; Rebouche et Seim, 1998; Panter et Mudd, 1969).

1.2 Pathologies humaines associées à la carnitine

Chez les animaux, la teneur en carnitine varie entre 0,2 et 6 μmol.g^{-1} de matière fraîche, les plus fortes concentrations se trouvant au niveau du cœur et des muscles squelettiques (Bremer, 1983) ce qui laisse supposer une importance de cette molécule dans ces organes.

Deux états distincts de carence en carnitine sont décrits chez l'homme. Il s'agit des états d'insuffisance primaire et secondaire avec parfois une impossibilité de distinction nette selon les symptômes (Flanagan *et al.,* 2010). L'insuffisance primaire est une maladie autosomale récessive rare associée à un trouble de l'oxydation des AG causée par un dysfonctionnement d'un transporteur plasmique de la carnitine $OCTN_2$ (Organic Cation Transporteur) (Wang *et al*., 1999). Cette pathologie peu fréquente, de 1 à 5 cas pour 10 000 personnes, se manifeste généralement entre 1 et 7 ans. Les conséquences en sont des cas d'encéphalopathie, de myopathie et de cardiomyopathie. Le gène responsable est connu et plusieurs mutations plus ou moins graves sont décrites (Burwinkel *et al*., 1999; Wang *et al*., 2000). Pour ces patients, le traitement requis est la supplémentation en carnitine à vie.

L'insuffisance secondaire, beaucoup plus fréquente mais moins sévère que l'insuffisance primaire, est liée à une excrétion urinaire élevée d'acyl-carnitines en réponse à l'accumulation d'acides organiques (Rinaldo *et al*., 1998; Rinaldo *et al*., 2002) en lien avec une alimentation inadaptée, une thérapie pharmacologique, certaines maladies métaboliques héréditaires, une malabsorption de la carnitine, des troubles hépatiques ou rénaux ou des épisodes de dialyses (Scaglia et Longo, 1999; Winter, 2003). Une supplémentation diététique en L-carnitine peut conduire à des améliorations dans plusieurs complications observées chez les patients urémiques.

1.3 Fonctions de la carnitine chez les animaux et les micro-organismes

1.3.1 Rôles dans le métabolisme énergétique

1.3.1.1 Transport intracellulaire des acides gras

Chez les animaux, les AG sont une source d'énergie indispensable pour les tissus de l'organisme. Cette énergie est convertie en ATP (Adénosine Triphosphate) par le cycle de Krebs (ou cycle TCA, cycle des acides tricarboxyliques) après production d'acétyl-CoA (Steiber *et al.*, 2004) par la β-oxydation des AG. La β-oxydation est la voie de dégradation des AG et a lieu principalement dans la matrice mitochondriale, mais certains AG sont préalablement pris en charge par le péroxysome (Wanders *et al*., 2001). Le processus consiste en l'oxydation des

LCFA (Long Chain Fatty Acid) et des MCFA (Moyen Chain Fatty Acid) dans la mitochondrie afin de produire des acétyl-CoA qui alimentent le cycle TCA. La β-oxydation péroxysomale permet quant à elle d'oxyder les VLCFA (Very Long Chain Fatty Acid) en MCFA qui sont ensuite redirigés vers la mitochondrie.

Il a été démontré un rôle prépondérant de la carnitine dans ce trafic intracellulaire des AG. Les AG sont préalablement activés par liaison thioester au Coenzyme A (CoA). Des carnitine acyl-transférases estérifient ensuite ces AG à la carnitine par un échange réversible entre le CoA et la carnitine (**Figure 2**). Ces enzymes possèdent une certaine spécificité vis-à-vis de leur substrat et sont localisées en fonction du devenir métabolique des acyl-carnitines qu'elles engendrent.

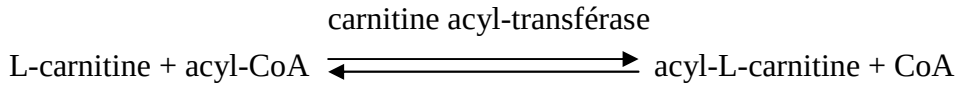


Figure 2: Réaction d'estérification entre la carnitine et les acyl-CoA.

Trois groupes d'acyl-carnitine transférases ont été identifiés et nommés selon leur substrat préférentiel (**Figure 3**): les carnitine acétyl-transférases (CAT) localisées dans le péroxysome et la mitochondrie, en charge des AG de 2 à 4 carbones, les carnitine octanoyl-transférases (COT) dans le péroxysome en charge des MCFA et les carnitine palmitoyl-transférases (CPT) présentes au niveau des membranes mitochondriales et en charge des LCFA. Une CAT et une CPT ont également été mises en évidence dans le réticulum endoplasmique (RE) (Ramsay *et al.*, 2001).

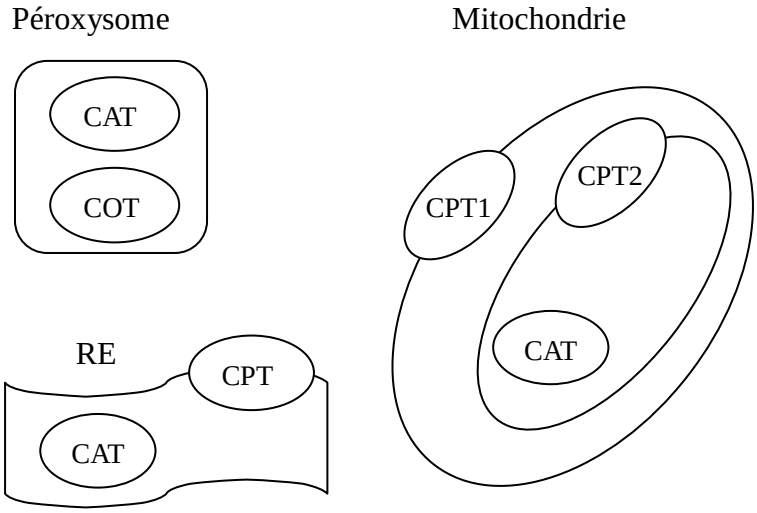


Figure 3: Localisation des carnitine acyl-transférases mises en évidence chez les animaux et

les levures. CAT: carnitine acétyl-transférases, COT: carnitine octanoyl-transférases, CPT1: carnitine palmitoyl-transférase 1, CPT2: carnitine-palmitoyl transférase, RE : réticulum endoplasmique.

La pénétration des LCFA et des produits de la β-oxydation péroxisomale (acétyl-CoA et MCFA-CoA) a lieu depuis le cytoplasme au niveau de la membrane externe mitochondriale (Steiber *et al.*, 2004) (**Figure 4**).

Les produits sont importés dans les mitochondries par un système impliquant les enzymes CPT1, CPT2 et une carnitine acyl-carnitine translocase (CACT) qui transporte les acyl-carnitines dans la mitochondrie sans spécificité de substrat (Kerner et Hoppel, 2000). Les acyl-CoA sont transformés en acyl-carnitines par la CPT1 (McGarry et Brown, 1997). Les acyl-carnitines peuvent diffuser à travers la membrane externe mais ne peuvent pas traverser la membrane interne. Ce transport est effectué par la CACT en échange de carnitine libre. Les AG ainsi incorporés dans la matrice mitochondriale sont ensuite transférés de la carnitine vers le CoA par la CPT2 (Ramsay *et al.* 2001) (**Figure 4**).

L'importation des AG du cytosol vers le péroxysome pour la β-oxydation se fait par des transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette) (Theodoulou *et al.*, 2006; Kemp *et al.*, 2011). Dans ce contexte, la carnitine et les activités carnitine-transférases péroxysomales interviendraient uniquement dans l'exportation des produits de la β-oxydation. L'acétyl- et les acyl-carnitines sont alors transportées à travers la membrane péroxisomale par une carnitine acyl-carnitine translocase (CAC) (Fraser et Zammit, 1999). La présence d'une activité CPT au niveau du RE suggère une intervention de la carnitine dans le transport des AG au niveau du réticulum endoplasmique lors de la synthèse des lipides membranaires ou des TAG (Owen *et al.* 1997; Washington *et al.*, 2003; Gooding *et al.*, 2004) (**Figure 4**).

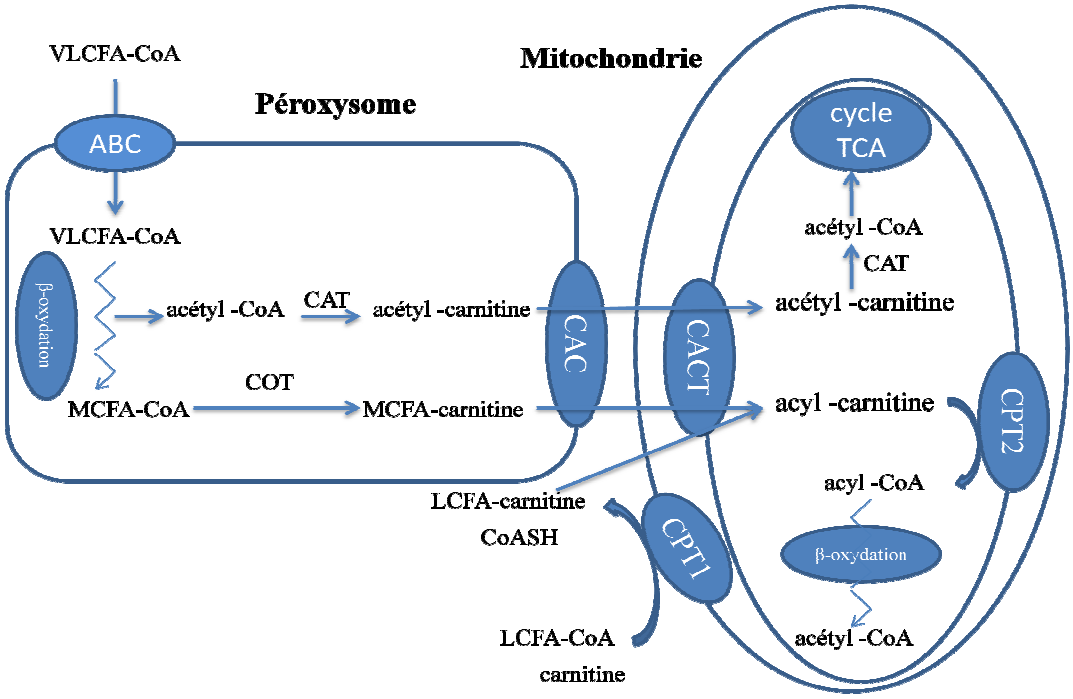


Figure 4: β-oxydation péroxysomale et mitochondriale chez les animaux. VLCFA: Very Long Chain Fatty Acid, LCFA: Long Chain Fatty Acid, MCFA: Moyen Chain Fatty Acid, ABC: ATP-Binding Cassette, CAC et CACT: carnitine acyl-carnitine translocase, CAT: carnitine acétyl-transférase, COT: carnitine-octanoyl transférase, CPT1: carnitine palmitoyl-transférase 1, CPT2: carnitine-palmitoyl transférase 2, CoA: Coenzyme A, CoASH : Coenzyme A réduit, TCA : acide tricarboxylique.

Chez les levures, la dégradation des AG a lieu exclusivement dans les péroxysomes. Les AG pénètrent dans le péroxysome par des transporteurs de type ABC (Hettema et Tabak, 2000). L'existence de deux voies pour le transport de l'acétyl-CoA a été mise en évidence par des travaux réalisés sur des mutants de levures (van Roermund *et al.*, 1999). Dans la première voie, l'acétyl-CoA produit est pris en charge par le cycle glyoxylique pour être transformé en succinate qui sera transporté vers la mitochondrie probablement via le transporteur Acr1p (van Roermund *et al.*, 1999). Cette voie est dépendante de la citrate synthase péroxysomale (CIT), première enzyme du cycle glyoxylique. La seconde voie alternative implique la carnitine. L'acétyl-CoA est transformé en acétyl-carnitine par une carnitine acétyl-transférase (CAT2) et est transporté vers les mitochondries par une carnitine acétyl-carnitine translocase (CRC1). Ces deux voies de transport se compensent dans la mesure où la mutation du gène *CIT2* ou du gène *CAT2* n'empêche pas la croissance de la levure sur de l'oléate, tandis que le double mutant ne peut pas se développer sur ce substrat du fait de son incapacité à oxyder cet AG (van Roermund *et al.*, 1995). Une fois dans la mitochondrie, la CAT2 mitochondriale régénère l'acétyl-CoA qui peut être pris en charge par le cycle de Krebs. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, cette CAT2p ainsi que la carnitine acétyl-transférase présente dans la mitochondrie sont codées

par un même gène appelé *CAT2* (Elgersma *et al.*, 1995) (**Figure 5**).

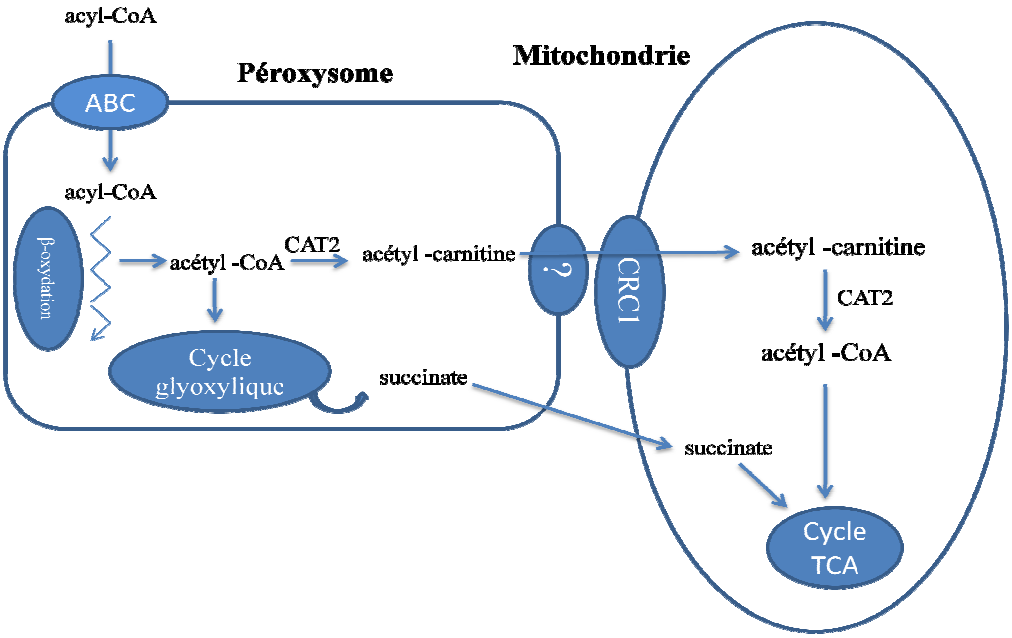


Figure 5: β-oxydation péroxysomale chez les levures. ABC: ATP-Binding Cassette, CAT2: carnitine acétyl-transférase, CRC1: carnitine acétyl-carnitine translocase, TCA: acide tricarboxylique.

Chez *Candida albicans*, qui ne possède pas la CIT péroxysomale, la délétion du gène *CAT2* entraine la perte de la capacité à croître sur un milieu contenant uniquement des AG ou des molécules en C2 (éthanol ou acétate) comme source de carbone, ce qui montre que le transport d'acétyl-CoA dépendant de la carnitine est essentiel pour la croissance de cette levure sur une source de carbone non fermentescible (Stijbis *et al.*, 2008).

1.3.1.2 Maintien du ratio acétyl-CoA/CoA

Chez les animaux, il a été démontré que la carnitine intervient dans le maintien d'un ratio acétyl-CoA/CoA mitochondrial compatible avec le bon fonctionnement cellulaire (Stephens *et al.*, 2007). Lors d'un effort physique, l'acétyl-CoA est généré plus rapidement par l'enzyme PDH (Pyruvate déshydrogénase) mitochondriale qu'il n'est pris en charge par le cycle TCA. Pour éviter une accumulation de ce précurseur dans la mitochondrie, le système carnitine qui implique une CAT va permettre l'équilibration rapide entre les couples acétyl-CoA/CoA et acétyl-carnitine/carnitine. L'acétyl-CoA en excès est transféré à la carnitine par la CAT ce qui permet de maintenir le Coenzyme A réduit (CoASH) disponible pour un fonctionnement optimal de la mitochondrie. Comme l'acétyl-carnitine mitochondrial peut être rapidement

échangé avec la carnitine cytosolique par l'enzyme CACT, ce système permet un maintien efficace du ratio (Steiber *et al.*, 2004). L'acétyl-carnitine résultant de ce transfert est exporté vers le cytosol et représente ainsi une réserve d'acétyl activé qui pourra être utilisée par le cycle TCA après réimportation dans la mitochondrie et action de la CAT (**Figure 6**).

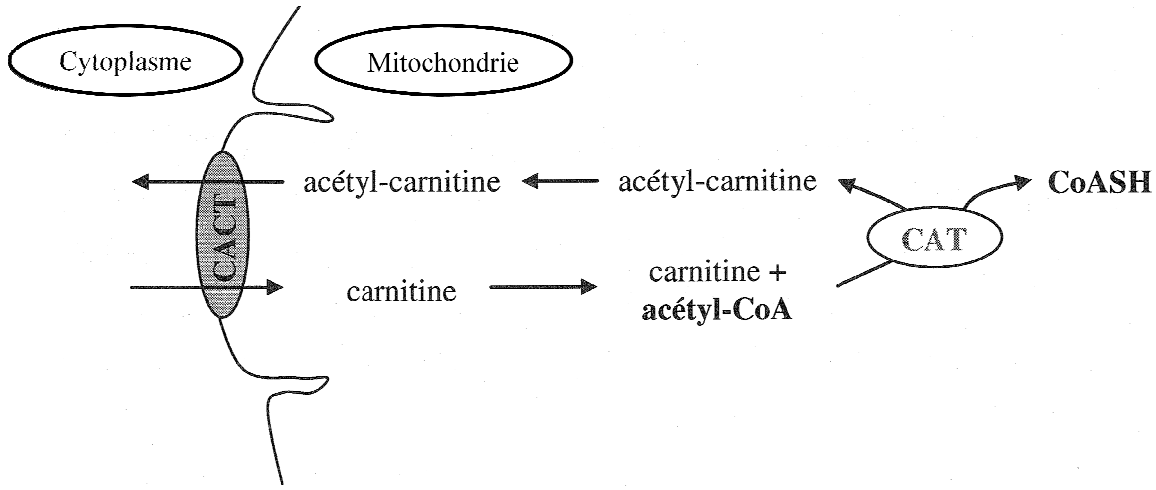


Figure 6: Maintien du ratio acétyl-CoA/CoA grâce au système carnitine (Bourdin, 2007).

1.3.2 Fonction de protection cellulaire

1.3.2.1 Action anti-oxydante

Différentes études décrivent que la carnitine et l'acétyl-carnitine ont des propriétés anti-oxydantes chez les animaux. Ainsi, la carnitine est impliquée dans la régulation de la production d'oxyde nitrique et de la respiration cellulaire (Brown, 1999). Elle serait inhibitrice de la péroxydation des lipides en participant à la diminution du taux de radicaux libres issus de la respiration qui endommagent les lipides, les protéines et l'ADN mitochondrial (Beckman et Ames, 1998; Kalaiselvi et Panneerselvam, 1998). De plus, des études décrivent également le rôle de la carnitine en tant qu'antioxydant par chélation de métaux impliqués dans la formation de radicaux libres (Binienda, 1999; Rani et Panneerselvam, 2001) mais aussi à travers sa capacité à délivrer des acétyl-CoA au cycle TCA, augmentant ainsi la production d'énergie nécessaire au fonctionnement optimal des cellules (Gülcin, 2006).

L'acétyl-carnitine pourrait permettre de protéger l'activité de certaines enzymes anti-oxydantes telles que la gluthatione déshydrogénase, la catalase et la superoxyde dismutase lors du vieillissement (Kalaiselvi et Panneerselvam, 1998; Rani et Panneerselvam, 2001; Calabrese *et al.*, 2006). La supplémentation en acétyl-carnitine permettrait également de

restaurer la synthèse de cardiolipines (phospholipides produits dans les mitochondries) atteintes lors du vieillissement et dont la modification engendre une fonction mitochondriale altérée (Calabrese *et al*., 2006). Ce sont les propriétés antioxydantes de l'acétyl-carnitine qui pourraient être à l'origine de son effet bénéfique pour le traitement des désordres synaptiques de la maladie d'Alzheimer et d'autres maladies dégénératives (Wang *et al.*, 2013).

Chez la levure, la carnitine est connue pour améliorer la tolérance au stress oxydatif. Des travaux ont démontré que la carnitine augmente la croissance de *S. cerevisiae* en présence de peroxyde d'hydrogène et qu'elle est impliquée dans la levée de la toxicité de certains acides organiques. Cependant ce rôle est indépendant des trois enzymes carnitine acyl-transférases et de la navette carnitine. Cet effet pourrait être dépendant d'un activateur de transcription (Yap1p) régulant la protection contre les oxydants (Franken *et al*., 2008).

1.3.2.2 Détoxification

Chez les animaux, la présence d'acyl-carnitines atypiques dans les urines témoigne de l'implication de la carnitine dans l'excrétion de certains xénobiotiques (valproate ou pivalate) potentiellement toxiques pour la cellule. Les AG complexes à usage thérapeutique, tels que le valproate ou le pivalate sont convertis dans la mitochondrie en leurs acyl-CoA respectifs et ne sont pas pris en charge par la β-oxydation. C'est la formation d'acyl-carnitine qui va permettre leur excrétion de la mitochondrie puis de la cellule évitant ainsi une accumulation toxique de ces composés (Arrigoni-Martelli et Caso, 2001).

1.3.2.3 Recyclage lipidique

Il a été mis en évidence que la carnitine a une fonction dans le recyclage de certains lipides. Ainsi certains types cellulaires sont capables de modifier la composition en AG de leurs phospholipides ou de leur TAG (triacylglycérol) par des cycles de déacylation/réacylation en utilisant les acyl-carnitines comme réserve de groupements acyls. La palmitoyl-carnitine, issue de l'activité catalytique de la CPT1 est un substrat pour la β-oxydation, mais elle constitue également un donneur de groupement acyl. La palmitoyl-carnitine participerait au recyclage des lipides membranaires des érythrocytes, ainsi que de certains phospholipides, de triglycérides dans les cellules neuronales (Arduini *et al.*, 1992; Arduini *et al.*, 1994).

1.3.2.4 Modulation de l’activité de protéines

La palmitoyl-carnitine serait également impliquée dans la signalisation cellulaire et la modification post-traductionnelle de protéines ou palmitoylation (Arduini *et al*.,1994). Il a été aussi montré que la palmitoyl-carnitine peut inhiber l'activation de la protéine kinase C impliquée dans la prolifération ou la différenciation cellulaire (Sobiesiak-Mirska et Nalecz, 2006). Ceci montre que les acyl-carnitines en tant que donneurs de groupement acyl pourraient servir à la régulation de l'activité de certaines protéines. De même d’autres travaux ont montré que la L-carnitine peut interagir avec des récepteurs protéiques, impliqués notamment dans la réponse aux glucocorticoïdes ou aux hormones thyroïdiennes (Manoli *et al*., 2004; Benvenga *et al.*, 2004).

1.3.3 Rôle d’osmolyte

Différentes études chez les bactéries ont montré que la carnitine est un soluté compatible qui peut s'accumuler à des teneurs élevées dans la cellule sans altérer les fonctions cytoplasmiques. La carnitine agit comme un osmolyte en aidant les cellules bactériennes à faire face à un stress osmotique tel qu’un stress salin (Canovas *et al*., 2007) ou un stress froid (Angelidis et Smith, 2003). La carnitine participerait ainsi aux contrôles des flux d’eau. Son implication a aussi été démontrée dans la barotolérance (Smiddy *et al*., 2004).

La carnitine est également susceptible d'être impliquée dans l'adaptation des cellules de certains tissus animaux contre l'hypertonie de l'environnement (Peluso *et al*., 2000; Cotton *et al.*, 2010). Elle est d’ailleurs actuellement envisagée dans le traitement de problèmes d’hyperosmolarité du film lacrymal (Nebbioso *et al.*, 2013).

1.4 Rôle de la carnitine chez les plantes

1.4.1 Présence de carnitine et d’acyl-carnitines chez les plantes

La carnitine a été mise en évidence et quantifiée dans différents tissus et organes de céréales et autres végétaux à partir des années 70 par méthode enzymatique (**Tableau 1**).

Tableau 1: Teneur en carnitine des plantes (a: Panter et Mudd, 1969; b: McNeil et Thomas, 1975; c: Rudman *et al*., 1977) (MS: matière sèche).

Matériel végétal	Teneur en carnitine ($\mu g.g^{-1}$ de MS)
Riz [c]	71
Avoine (graine)[a]	1
Avoine (plantule)[a]	14
Blé (graine)[a]	4
Blé (plantule)[a]	4
Chou fleur[a]	14
Pois[b,c]	11
Avocat[a]	48

Récemment, l'utilisation de la Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse (LC/ESI-MS/MS) a permis de mettre en évidence et quantifier des esters de carnitine au côté de la carnitine chez les végétaux (Bourdin *et al.*, 2007). Ainsi ces composés ont été quantifiés dans des tissus de plantes oléagineuses et non oléagineuses (Arabidopsis, tabac, colza et lin). La teneur moyenne en carnitine y est comprise entre 1 et 5 $ng.mg^{-1}$ de matière sèche (**Tableau 2**).

Tableau 2: Teneur en carnitine chez les plantes (MS: matière sèche) (Bourdin *et al.*, 2007).

	Arabidopsis	Tabac	Lin	Colza
Carnitine ($ng.mg^{-1}$ MS)	1,1±0,2	2,7±1,7	5,1±3,1	3,2±2,1

La carnitine est associée à des acyls allant des courtes chaines carbonées (C2) aux longues chaines carbonées (C20). Chez Arabidopsis, la teneur en acyl-carnitines représente 2 % du pool de carnitine libre (0,021±0,0003 $ng.mg^{-1}$ de matière sèche). Il faut noter également que la teneur en carnitine et acyl-carnitines est respectivement cent et mille fois moins importante chez les plantes que chez les animaux (Bourdin *et al.*, 2007).

1.4. 2 Activités carnitine acyl-transférases chez les végétaux

Des activités carnitine acyl-transférases ont été mises en évidence dans différents compartiments cellulaires chez les végétaux. En 1973, Panter et Mudd ont mis en évidence

l'oxydation de la palmitoyl-carnitine par des mitochondries isolées du mésocarpe d'avocat. Ils ont suggéré la présence d'une CPT et d'un système de transport proche de l'animal, nécessaire à la conversion de la palmitoyl-carnitine en palmitoyl-CoA, substrat pour la β-oxydation. Ensuite, d'autres équipes ont pu mesurer des activités CAT dans la matrice mitochondriale de cotylédons de pois ainsi que des activités CPT sur la membrane externe et interne (Burgess et Thomas, 1986; Thomas et Wood, 1986). Des activités CAT et CPT ont également été détectées dans des mitochondries d'hypocotyles de haricot (Gerbling et Gerhardt, 1988). En 1995, Schwabedissen-Gerbling et Gerhardt ont purifié et caractérisé une carnitine acyl-transférase à large spécificité de substrats dans des mitochondries isolées d'hypocotyles de haricot. Les propriétés biochimiques (petite taille, structure monomérique, insensibilité au malonyl-CoA) de cette enzyme, laissaient penser à une CAT pouvant prendre en charge aussi bien les acyl-CoA à courtes chaines (C2) que les acyl-CoA à longues chaines (C16; C18; C18:1; C18:2; C18:3). Des activités CAT et CPT ont également été détectées dans des étioplastes d'orge (Thomas *et al*., 1983) et des chloroplastes de pois (McLaren *et al*., 1985; Masterson et Wood, 2000[1][2]). En revanche, aucune étude à ce jour n'a pu montrer la présence de carnitine acyl-transférase dans le péroxysome (Miernyk et Trealase, 1981; Bieber *et al*., 1981; Gerbling et Gerhardt, 1988) (**Tableau 3**).

Tableau 3: Localisation cellulaire des différentes acyl-carnitines transférases mises en évidence chez les plantes (a: Burgess et Thomas, 1986; b: Thomas et Wood, 1986; c : Masterson et Wood, 2000[1][2]).

Localisation cellulaire	Activités acyl-carnitine transférases
Mitochondries	CAT[a], CPT(e)[b],CPT(i)[b]
Chloroplastes	CAT[c], CPT[c]

1.4.3 Transport de la carnitine chez les plantes

Chez les animaux, les transporteurs de cations organiques OCTN 1 à 3 sont impliqués dans l'homéostasie et la distribution de la carnitine dans les différents tissus avec une affinité plus ou moins grande (Tamai *et al*., 1998 et 2000). Chez la levure c'est la protéine AGP2 qui est en charge du transport de la carnitine à travers la membrane plasmique (van Roermund *et al*., 1999). En 2007, la protéine d'Arabidopsis AtOCT1, qui partage la plupart des caractéristiques structurales et biochimiques des OCTN animales, a été étudiée (Lelandais-Brière *et al*., 2007). Sa capacité à complémenter le double mutant de levure Δ*cit2/agp2* (van Roermund *et al*., 1999) a permis de la proposer comme capable de transporter la carnitine à travers la membrane plasmique végétale.

Il n'existe aucune donnée relative au transport potentiel d'acétyl-carnitine ou d'acyl-carnitines à travers les membranes mitochondriale ou chloroplastique. Chez les plantes, seule la protéine BOU (A BOUT DE SOUFFLE) d'Arabidopsis, qui présente une certaine homologie avec les CACT animale et de levure, a été proposée pour ce rôle de translocase dans les mitochondries (Lawand *et al*., 2002). Mais, l'analyse de la fonction de transport de BOU par complémentation d'un mutant de levure et par construction dans des protéoliposomes n'a pas permis de démontrer son implication dans le transport de carnitine et d'acyl-carnitines (Bourdin, 2007). En 2013, la protéine BOU a été proposée comme transporteur mitochondrial impliqué dans la photorespiration (Eisenhut *et al*., 2013).

1.4.4 Rôle de la carnitine dans le métabolisme lipidique chez les plantes

Les données portant sur les activités carnitine transférases mesurées dans différents tissus végétaux et la quantification d'acyl-carnitines au côté de la carnitine libre chez les plantes indiquent que la carnitine y est associée au métabolisme lipidique comme c'est le cas chez l'animal et la levure.

1.4.4.1 Implication de la carnitine dans le catabolisme des réserves lipidiques:

Chez les plantes oléagineuses, les lipides de réserve sont rapidement convertis en hydrates de carbone solubles, après le début de la germination. Les lipases hydrolysent les triglycérides stockés dans les oléosomes. Les AG produits sont activés en esters d'acyl-CoA et pénètrent dans le péroxisome via un transporteur ABC où ils sont décomposés en acétyl-CoA par la β-oxydation. Les acétyl-CoA formés vont alimenter le cycle glyoxylique où ils sont convertis en succinate. Ce dernier est transporté dans la mitochondrie pour alimenter le cycle de Krebs (Li-Beisson *et al*., 2013) (**Figure 7**).

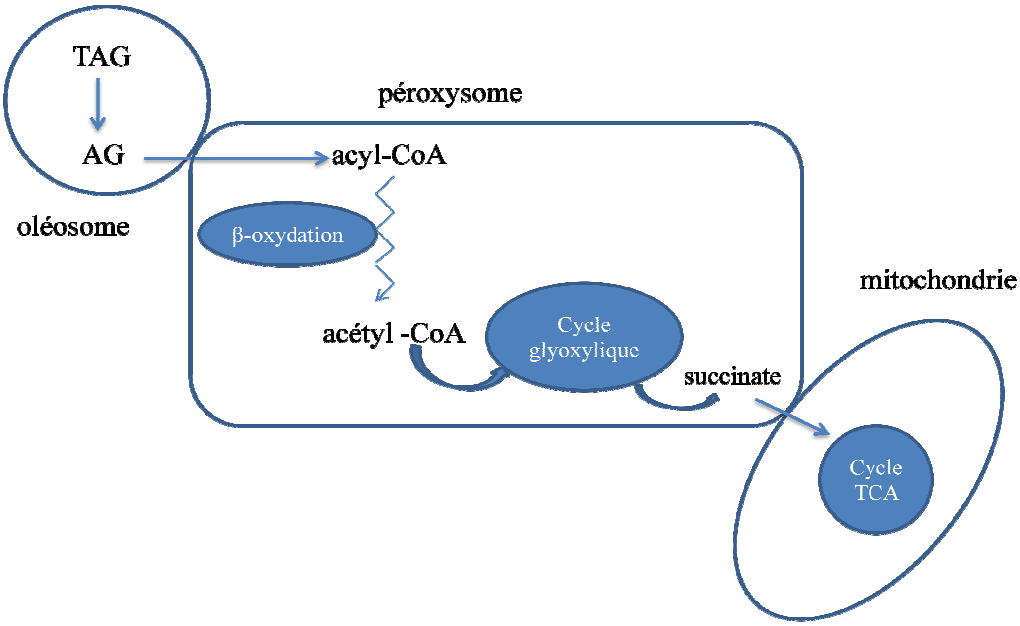


Figure 7: Mobilisation des réserves au cours de la germination d'*Arabidopsis thaliana* (TAG: Triacylglycérol, AG : Acide Gras, TCA: Cycle des Acides Tricarboxyliques).

Ainsi chez les plantes, le catabolisme des AG est localisé dans le péroxisome comme chez les levures, mais des études relatent également l'existence d'une β-oxydation mitochondriale (Dieuaide *et al*., 1993) dont certaines mettent en évidence une implication de la carnitine (Masterson et Wood, 2000[3][4]).

Des études ont montré que l'oxydation du palmitate dans les mitochondries de cotylédon de pois n'est possible qu'en présence de CoASH, Mg^{2+}, ATP, malate et de carnitine (Thomas et McNeil, 1976; Wood *et al*., 1984). De plus comme indiqué précédemment, des activités carnitine acyl-transférases de type CAT et CPT ont été mises en évidence dans des mitochondries de différents tissus végétaux (Burgess et Thomas, 1986; Thomas et Wood, 1986; Gerbling et Gerhardt, 1988). Ces données réunies plaident en faveur de l'existence d'un transport carnitine dépendant nécessaire à une β-oxydation mitochondriale des AG et/ou au métabolisme mitochondrial. Récemment, il a été montré que l'etomoxir, connu chez l'animal pour être un inhibiteur irréversible de la carnitine palmitoyl-transférase de la membrane externe des mitochondries, a un effet inhibiteur sur la β-oxydation mitochondriale dans les cotylédons de plantules de pois, sans affecter la β-oxydation péroxysomale (Masterson et Wood, 2009). Il est possible que la β-oxydation mitochondriale qui entraîne la phosphorylation oxydative (Schulz, 1991) et les exportations d'acétyl-CoA via un système carnitine acyl-transférase (Wood *et al*., 1992), fournisse l'ATP et/ou l'acétyl-CoA nécessaires à la biosynthèse des lipides membranaires. Le rôle de la CAT pourrait concerner le maintien du ratio acétyl-CoA/CoA de la même manière que dans les cellules animales.

1.4.4.2 Implication de la carnitine dans la synthèse des lipides

Contrairement aux autres eucaryotes, le lieu de synthèse des AG chez les plantes est le plaste et non le cytosol. Cette voie de synthèse de type procaryotique n'est pas limitée à certains organes ou tissus mais a lieu dans tous les types cellulaires, qu'ils soient chlorophylliens ou non. Le composé initial utilisé pour la synthèse des AG est l'acétyl-CoA. Certains AG restent dans le plaste pour permettre la synthèse de lipides ainsi qualifiés de procaryotiques, d'autres sont exportés vers le RE sous forme d'acyl-CoA pour entrer dans la voie eucaryotique de synthèse lipidique (Li-Beisson *et al.*, 2013). Le mécanisme d'export des AG des plastes est inconnu.

Des activités CAT et CPT chloroplastiques (Masterson et Wood, 2000[1][2]) suggèrent que l'acétyl-carnitine pourrait être un substrat pour la synthèse des AG. Certaines données permettent d'envisager l'acétyl-carnitine comme, non seulement la forme de transport de l'acétyl-CoA dans les plastes, mais aussi comme le substrat préférentiel dans la synthèse des AG (Masterson *et al.*, 1990). La relation entre la carnitine et la synthèse d'AG a aussi été évoquée dans une étude sur des cultures de tissus de *Kalanchoe crenata* montrant que la synthèse des AG est stimulée par de la carnitine exogène (Wood *et al.*, 1992). D'autres recherches ne confirment pas ce lien entre la carnitine et la synthèse d'AG, et réfutent l'acétyl-carnitine comme un précurseur préférentiel pour la synthèse d'AG (Roughan *et al.*, 1993). Le rôle de la CAT/CPT chloroplastique est donc encore sujet à controverse mais de par son activité CPT elle pourrait être en charge de l'exportation des acyl-CoA vers le RE (Thomas *et al.*, 1983).

Par le mécanisme d'acyl-éditing, les AG insaturés formés sont échangés avec les acyl-CoA cytosoliques, qui pourraient être introduits dans le chloroplaste via un système de transport carnitine dépendant. Chez le pois, les CPT identifiées auraient une forte affinité pour la palmitoyl-carnitine, les esters de carnitine à longues chaines insaturées (C18:2; C18:3) et la CPT serait sensible au malonyl-CoA, comme son homologue animal (Masterson et Wood, 2000[2]). Une des fonctions principales de ces CPT serait alors la réimportation d'AG insaturés vers le chloroplaste. Il a également été montré qu'une supplémentation du milieu de culture en carnitine, induirait une augmentation des teneurs en chlorophylles dans les tissus étudiés (Thomas *et al.*, 1981; Wood *et al.*, 1992; Masterson et Wood, 2009). La carnitine ne serait pas impliquée directement dans la voie de biosynthèse des chlorophylles, mais contribuerait plutôt à fournir les substrats nécessaires à la biogénèse des membranes chloroplastiques.

1.4.5 Rôle de la carnitine dans la tolérance au stress abiotique chez les plantes

Des travaux réalisés récemment ont montré que la carnitine confère aux plantes une tolérance au stress abiotique comme c'est le cas dans les autres règnes. Ainsi elle améliore le développement et le rétablissement de jeunes plantules d'Arabidopsis dans des conditions de stress salin (Charrier *et al.,* 2012)**.** L'effet osmoprotectant de la carnitine est comparable à celui de la proline qui est un osmolyte avéré chez les plantes (Verbruggen et Hermans, 2008; Ashraf et Foolad, 2007). Les deux composés améliorent également la survie des plantules lors d'un stress oxydatif (présence d'H_2O_2 dans le milieu de culture). La carnitine pourrait, comme la proline, intervenir dans la résistance au stress salin à travers ses propriétés antioxydantes (Ashraf et Foolad, 2007; Ghars *et al*.,2008; Charrier *et al.,* 2012).

2. Biosynthèse de la carnitine

2.1 Biosynthèse de la carnitine chez l'animal

2.1.1 Voie de biosynthèse de la carnitine

Chez l'homme, il est estimé que les trois quarts de la carnitine de l'organisme proviennent de l'alimentation, pour une très large partie des produits carnés et dans une moindre mesure des aliments d'origine végétale (Tein *et al*., 1996). Chez les personnes qui suivent un régime strictement végétarien, habitués à de faibles teneurs en carnitine, la biodisponibilité de ce composé est plus importante que chez les consommateurs de viande (Rebouche et Chenard, 1991). Pour garantir une homéostasie de cette bétaïne essentielle à l'organisme, il existe également une biosynthèse endogène. Cette synthèse a lieu principalement dans les reins, le foie et le cerveau chez les mammifères (Tanphaichitr et Broquist, 1974; Rebouche et Engel, 1980).

Le mode de synthèse de la carnitine animale a été très étudié, notamment chez le rat, dès les années soixante (Bremer, 1962[2]). On sait désormais que le squelette carboné de la carnitine provient de l'acide aminé lysine et les groupes 4-N-méthyls proviennent de la méthionine. C'est une méthyl-transférase qui est en charge de la réaction permettant la synthèse du précurseur initial qu'est la 6-N-triméthyllysine (TML). Chez les mammifères la TML peut également provenir de la dégradation lysosomale ou protéasomale des protéines contenant des lysines N-méthylées (Paik et Kin, 1971). Quatre réactions enzymatiques vont ensuite conduire à l'obtention de la carnitine (**Figure 8**).

Dans un premier temps, la TML est hydroxylée en position 3 par la TML dioxygénase

(TMLD; EC 1.14.11.8) qui catalyse ainsi la formation de 3-hydroxy-6-*N*-TML (HTML). Ce composé est alors clivé en 4-trimethylaminobutyraldeyde (TMABA) et en glycine par une HTML aldolase (HTMLA; EC 4.1.2.X). Le TMABA est ensuite oxydé par une TMABA déshydrogénase (TMABADH; EC 1.2.1.47) et permet la formation du 4-N-trimethylaminobutyrate ou γ-butyrobetaine (γ-BB). Enfin, la γ-BB est transformée par la γ-BB dioxygénase (BBD; EC 1.14.11.1) en carnitine (Vaz et Wanders, 2002).

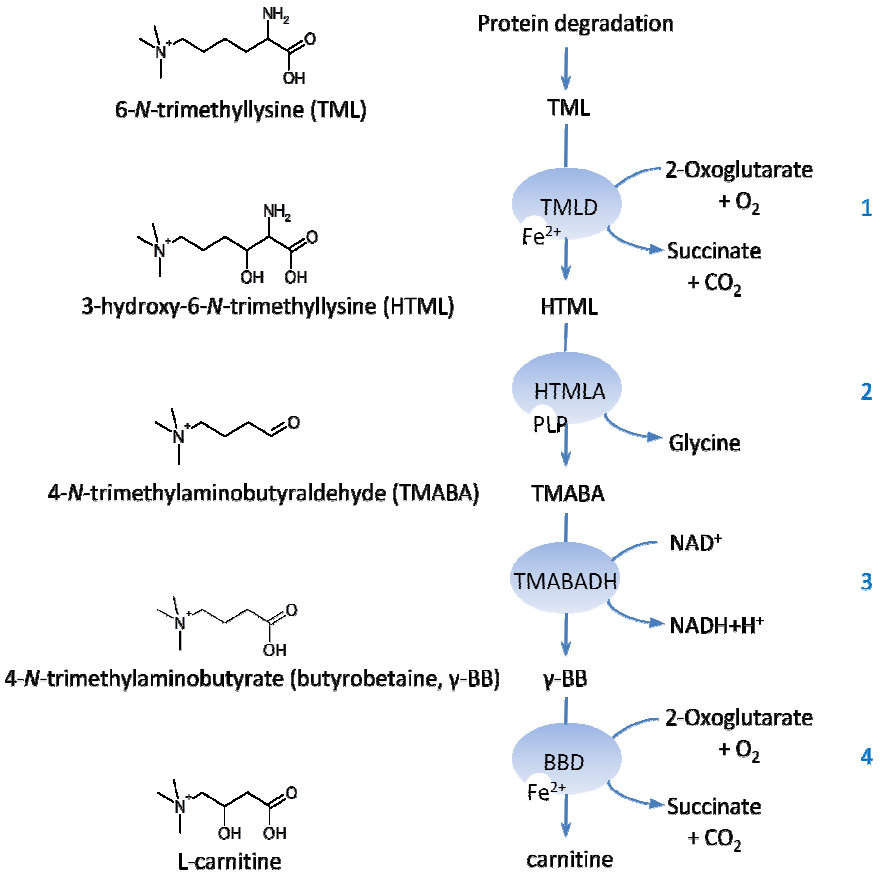


Figure 8: Biosynthèse de la carnitine chez les mammifères (d'après Vaz et Wanders, 2002).

Des travaux ont permis de caractériser les gènes codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse de la carnitine et certaines de ces protéines ont été caractérisées au niveau moléculaire.

2.1.2 TMLD

La première enzyme de la voie de biosynthèse de la carnitine a d'abord été étudiée par Hulse et ses collaborateurs (Hulse *et al*., 1978), qui ont montré que des mitochondries de foie de

rat étaient capables de faire la réaction d'hydroxylation de la TML et de produire de l'HTML. Cette enzyme est une dioxygénase à fer ferreux non hémique, qui a besoin de 2-oxoglutarate et d'oxygène moléculaire comme cofacteurs.

Chez l'homme et le rat, l'activité TMLD est présente dans le foie, les muscles squelettiques, le cœur, le cerveau et pour la part la plus importante dans le rein (Stein et Englard, 1982; Rebouche et Engel, 1980). Des expériences de localisation subcellulaire ont montré que la TMLD était une enzyme mitochondriale (Hulse *et al*., 1978; Sachan et Hoppel, 1980; Vaz *et al*., 2001) à la différence des trois autres enzymes de la voie de biosynthèse de la carnitine qui, comme indiqué plus loin, sont cytosoliques.

La TMLD est un homodimère d'environ 87 kDa. La séquence codante pour la protéine de rat a été déterminée. D'une longueur de 1218 pb, elle code pour un polypeptide de 405 acides aminés et d'une masse moléculaire de 47,5 kDa (Vaz *et al*., 2001). Ceci a également permis d'identifier les orthologues humains et murins ainsi que la localisation chromosomique du gène humain.

2.1.3 HTMLA

La deuxième enzyme impliquée dans la biosynthèse de la carnitine est l'HTML aldolase (HTMLA). L'activité enzymatique la plus importante a été mise en évidence dans le foie (Rebouche et Engel, 1980).

Il est proposé chez l'animal que l'enzyme HTMLA soit une sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT). En effet, une SHMT purifiée à partir de foie de lapin est capable de convertir le substrat HTML en TMABA et glycine (Henderson *et al*., 1980; Henderson *et al*., 1982). Les SHMT forment une classe d'enzymes PLP-dépendantes (5' phosphate de pyridoxal) qui effectuent notamment l'interconversion entre la sérine et la glycine en présence de tétrahydrofolate. Le cofacteur PLP est un dérivé de la pyridoxine (vitamine B_6). L'hypothèse d'une implication d'une enzyme PLP-dépendante dans la synthèse de carnitine est renforcée par le fait que la synthèse de γ-butyrobétaïne et de carnitine à partir de TML est inhibée par l'acide 1-amino-D-proline, un antagoniste de la vitamine B_6. Ce composé limite la synthèse de carnitine de 60-80% et conduit à l'accumulation de HTML (Dunn *et al*., 1982). Par ailleurs, des rats maintenus sous un régime déficient en vitamine B_6 présentent une diminution significative des niveaux de carnitine dans les tissus extra-hépatiques (Cho et Leklem, 1990). Deux isoformes de SHMT sont présentes dans les cellules animales: une localisée dans le cytoplasme et une localisée dans les mitochondries. La SHMT cytosolique humaine est présente principalement dans les muscles squelettiques, les reins et le foie, alors que la SHMT

mitochondriale est ubiquitaire (Girgis *et al*., 1998). Si l'HTMLA est identique à l'une des SHMT, la forme cytosolique est le candidat le plus probable. En effet l'HTMLA est localisée dans le cytoplasme et l'activité SHMT cytosolique est détectée de façon prédominante dans les tissus connus comme ayant une activité HTMLA (Rebouche et Engel, 1980). Le gène humain codant pour l'enzyme cytosolique est connu ainsi que sa localisation chromosomique (Garrow *et al.*, 1993). Mais, à ce jour, le fait que l'HTMLA soit une SHMT reste à démontrer.

Une autre famille d'enzymes susceptibles de prendre en charge la conversion de HTML en TMABA est la famille des thréonine aldolases (TA) également dépendantes du PLP et qui est proposée chez les mammifères sur la base de travaux réalisés chez la levure *Candida albicans* (Strijbis *et al.*, 2009). Les deux enzymes réalisent un clivage aldolytique de leur substrat en glycine et acétaldéhyde (**Figure 9**).

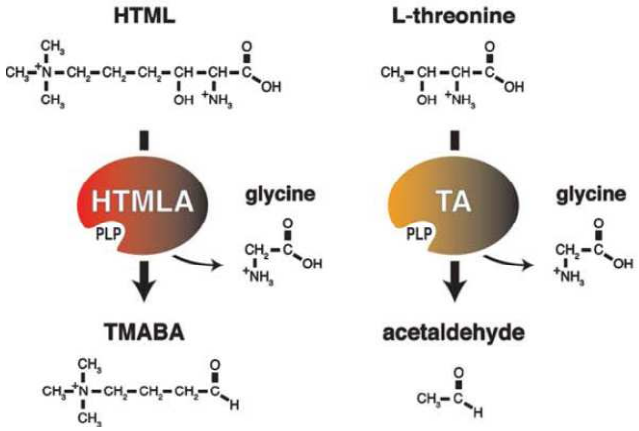


Figure 9: Comparaison entre réaction de l'enzyme HTMLA et TA (d'après Strijbis *et al.*, 2009).

L'expression des gènes codant pour les enzymes TA, *THA1P* chez l'homme et *GLY1* chez la souris, a été étudiée (Edgar, 2005). Il semble que le gène *THA1P* soit un pseudogène non fonctionnel chez l'homme alors que le gène *GLY1* est exprimé dans les tissus adultes comme la prostate, le cœur et le foie. La protéine GLY1 pourrait donc être l'HTMLA chez les rongeurs (Strijbis *et al.*, 2010).

2.1.4 TMABADH

La troisième réaction de la voie de biosynthèse de la carnitine est la déshydrogénation de la TMABA pour donner le 4-N-trimethylaminobutyrate ou γ-butyrobétaïne (γ-BB). La TMABADH (TMABA déshydrogénase) a été isolée par Hulse et Henderson à partir d'une fraction cytoplasmique de foie de bœuf et de rat (Hulse et Henderson, 1979; Hulse et

Henderson, 1980). Cette enzyme est une enzyme NAD^+ dépendante et son activité est facilement mesurée par spectrophotométrie en suivant l'apparition du NADH (Hulse et Henderson, 1980). Dans les tissus humains, l'activité la plus importante est détectée dans le foie et les reins, mais elle est faible dans le cerveau, le cœur et les muscles (Rebouche et Engel, 1980).

La séquence de l'ADN codant pour la TMABADH de foie de rat a été déterminée plus récemment (Vaz *et al*., 2000). Ceci a permis d'identifier les séquences humaines et de souris. La TMABADH de rat est fortement homologue à une enzyme précédemment identifiée comme l'aldéhyde déshydrogénase ALDH9 humaine (Vaz *et al*., 2000; Abe *et al*., 1990, Kikonyogo et Pietruszko, 1996; Lin *et al*., 1996). Cette ALDH cytosolique prend en charge des substrats qui ressemblent au TMABA, comme le 4-aminobutyraldéhyde et le 2-triméthylaminoéthanal (bétaïne aldéhyde). Les produits obtenus sont le 4-aminobutyrate et la bétaïne et sont impliqués dans diverses fonctions cellulaires. Le gène *ALDH9* est principalement exprimé dans le foie, les reins, le cœur et les muscles (Lin *et al*., 1996; Izaguirre *et al*., 1997), tissus contenant également des niveaux élevés d'activité TMABADH (Rebouche et Engel, 1980). L'expression hétérologue d'ALDH9 dans *E. coli* a montré que la protéine recombinante a la plus forte activité avec le substrat TMABA. De même une comparaison de la capacité à prendre en charge une variété de substrats (γ-aminobutyraldéhyde, γ-trimethylaminobutyraldehyde et la bétaïne aldéhyde) entre la TMABADH de rat et la protéine humaine ALDH9 montre que les deux enzymes ont des spécificités de substrat très similaires (Vaz *et al*., 2000). La protéine ALDH9 est donc proposée comme étant la TMABADH humaine.

2.1.5 BBD

Au cours de la quatrième étape de la voie de biosynthèse de la carnitine, la γ-BB est hydroxylée par la BBD pour donner la L-carnitine. La BBD, comme la TMLD, est une dioxygénase qui incorpore une molécule d'oxygène dans son substrat. Les deux enzymes nécessitent les mêmes cofacteurs (Lindstedt et Lindstedt, 1970). La séquence primaire de la BBD a été obtenue à partir de la bactérie *Pseudomonas* sp. AK 1, capable de se développer sur de la butyrobétaïne en tant que seule source de carbone et d'azote (Lindstedt *et al*., 1970).

La BBD est localisée dans le cytosol (Lindstedt et Lindstedt, 1970; Galland *et al*., 1998, Vaz *et al*., 1999). En 1998, l'ADN humain codant pour la BBD a été séquencé. D'une séquence de 1161 pb, il code pour une protéine de 44,7 kDa (Vaz *et al*., 1998). Une analyse de l'expression du gène correspondant a montré une forte expression dans le rein, une expression modérée dans le foie et une expression faible dans le cerveau (Vaz *et al*., 1998). Des données montrent également une activité BBD dans les testicules et l'épididyme de rat (Tanphaichitr et

Broquist, 1974), mais les données obtenues depuis sur la séquence codante suggèrent l'intervention d'une isoforme protéique dans ces organes (Galland *et al*., 1999). Chez l'homme, l'activité BBD dans le foie est faible à la naissance et augmente pendant la puberté pour atteindre sa valeur maximale à l'âge adulte. Néanmoins, dans les reins cette activité est présente dès la naissance (Olson et Rebouche, 1987).

2.1.6 Homéostasie de la carnitine chez l'homme

La distribution tissulaire des enzymes permettant la synthèse de la carnitine chez l'homme est connue. L'activité la plus élevée pour la TMLD est détectée dans les reins, mais elle est aussi présente dans le foie, le cœur, les muscles et le cerveau. L'activité HTMLA se trouve principalement dans le foie, alors qu'elle est faible dans les autres tissus étudiés. Le taux d'oxydation du TMABA par la TMABADH est plus important dans le foie, existe également dans les reins, mais est faible dans le cerveau, le cœur et les muscles. Ces résultats montrent que tous les tissus étudiés contiennent les enzymes nécessaires pour convertir la TML en γ-BB. Mais, seuls les reins, le foie et le cerveau sont capables de la convertir en carnitine, avec une activité BBD plus importante dans les reins (Englard 1979; Rebouche et Engel, 1980). Un schéma illustrant l'homéostasie de la carnitine chez l'homme est représenté sur la **figure 10**. Le rein réabsorbe efficacement la carnitine et la γ-butyrobétaïne, minimisant ainsi la perte urinaire de ces deux composés (Vaz et Wanders, 2002).

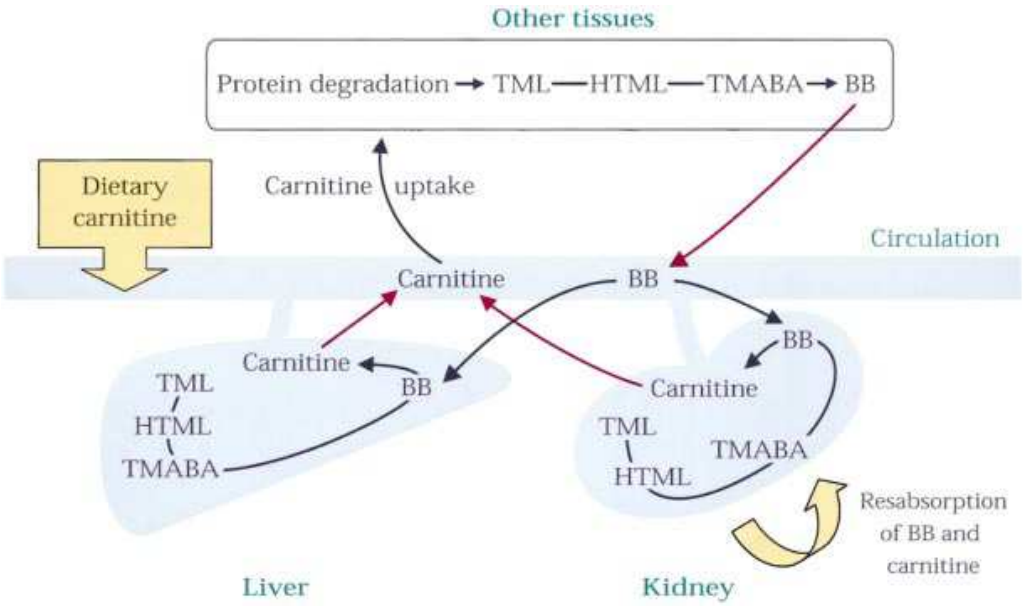


Figure 10: Homéostasie de la carnitine chez l'homme (Vaz et Wanders, 2002).

2.2 Biosynthèse de la carnitine chez les levures

Comme indiqué précédemment, la carnitine joue un rôle dans le transport d'acétyl-CoA du péroxysome vers la mitochondrie chez les levures. *Neurospora crassa* et *C. albicans* sont capables de synthétiser la carnitine par une voie de biosynthèse comparable à celle des animaux (Kaufman *et al*., 1977; Strijbis *et al*., 2009). D'autres levures comme *S. cerevisiae* sont incapables de synthétiser la carnitine mais l'utilisent pour leur métabolisme en le prélevant dans leur environnement (Swiegers *et al*, 2001). Des études génétiques chez la levure *C. albicans* ont conduit à l'identification des enzymes impliquées dans la synthèse de la carnitine (Strijbis *et al*., 2009).

2.2.1 TMLD et BBD

Les séquences humaines codant pour les enzymes TMLD et BBD ont permis d'identifier des gènes candidats orthologues chez *C. albicans*. Deux phases ouvertes de lecture non caractérisées (*orf19.4316* et *orf19.713*) qui par prédiction de traduction ont une similarité de séquence de 35% et 21% avec la TMLD et la BBD humaines respectivement, ont ainsi été identifiées. L'obtention de mutants perte de fonction de ces gènes et la restauration de la croissance des levures sur source de carbone non fermentescible en ajoutant au milieu de culture de la TMABA ou de la carnitine ont confirmé la fonction de ces enzymes (Strijbis *et al*., 2009).

2.2.2 HTMLA

Le génome de *C. albicans* porte deux séquences codant pour des thréonine aldolases. Il s'agit de *GLY1* et de l'*orf19.6305*. Une étude génétique et biochimique détaillée a permis de montrer récemment que la protéine codée par l'*orf19.6305* est majoritairement en charge de la conversion de HTML en TMABA chez cette levure et est proposée comme étant l'HTMLA (Strijbis *et al.*, 2009). Cependant cette étape de la voie de biosynthèse n'est pas aussi simple que les autres étapes chez la levure. En effet des mutants perte de fonction de la TMLD, TMABADH ou BBD sont incapables de pousser sur une source de carbone non fermentescible du fait de leur incapacité à transporter les unités acétyles. Au contraire, des mutants perte de fonction de l'HTMLA ou des doubles mutants *htmla/gly1* sont encore capable de pousser (**Tableau 4**). Une forme cytosolique de SHMT est proposée comme troisième enzyme impliquée à cette étape de la voie de biosynthèse de la carnitine (Strijbis *et al.*, 2010).

Tableau 4: Taux de croissance (en h^{-1}) de souches de *C. albicans* sauvage ou mutantes sur un milieu minimal oléate et acétate (Strijbis *et al*., 2010).

Souches	Milieu oléate	Milieu acétate
Sauvage	0,238	0,100
glyl	0,278	0,091
htmla	0,138	0,066
htmla/glyl	0,080	0,067

2.2.3 TMABADH

La protéine humaine TMABADH (ALDH9) a permis d'identifier le gène codant pour la TMABADH chez *C. albicans*. La protéine identifiée codée par l'*orf19.6306* a une identité de séquence de 35% avec la TMABADH humaine. La fonction de la protéine a été démontrée après obtention d'un mutant perte de fonction de ce gène et restauration de la croissance des levures sur source de carbone non fermentescible en ajoutant au milieu de culture de la γ-BB (Strijbis *et al*., 2009). Il a été remarqué que le gène codant pour la TMABADH était proche génétiquement de celui codant pour l'HTMLA. En effet ces gènes sont transcrits dans des directions opposées et partagent une région en amont de 1000 pb, ce qui semble indiquer des éléments de promoteur en commun et une coordination de l'expression (Strijbis *et al*., 2010).

2.3 Etat des connaissances sur la biosynthèse de la carnitine chez les plantes

Comme les mammifères et les micro-organismes, les plantes sont certainement capables de prélever la carnitine dans leur milieu de croissance du fait d'interactions rhizosphériques (Warren, 2013). Cependant la mise en évidence de carnitine dans des cultures axéniques d'Arabidopsis montre qu'elles sont également capables de synthétiser ce composé. Récemment des analyses d'extraits de jeunes plantules d'Arabidopsis par spectrométrie de masse ont permis de mettre en évidence la présence de TML et de γ-BB, pour lesquels des standards commerciaux existent (Rippa *et al.,* 2012) (**Figure 11, A**).

De plus, lorsque de la TML deutérée ($[^2H_9]$-TLM) est ajoutée dans le milieu de culture des plantules, de la γ-BB deutérée et de la carnitine deutérée sont retrouvés dans les extraits végétaux par spectrométrie de masse (**Figure 11, B**) (Rippa *et al.,* 2012). Ces travaux montrent qu'il y a une similitude entre les voies de biosynthèse de la carnitine chez Arabidopsis et les autres eucaryotes chez lesquelles elle est caractérisée.

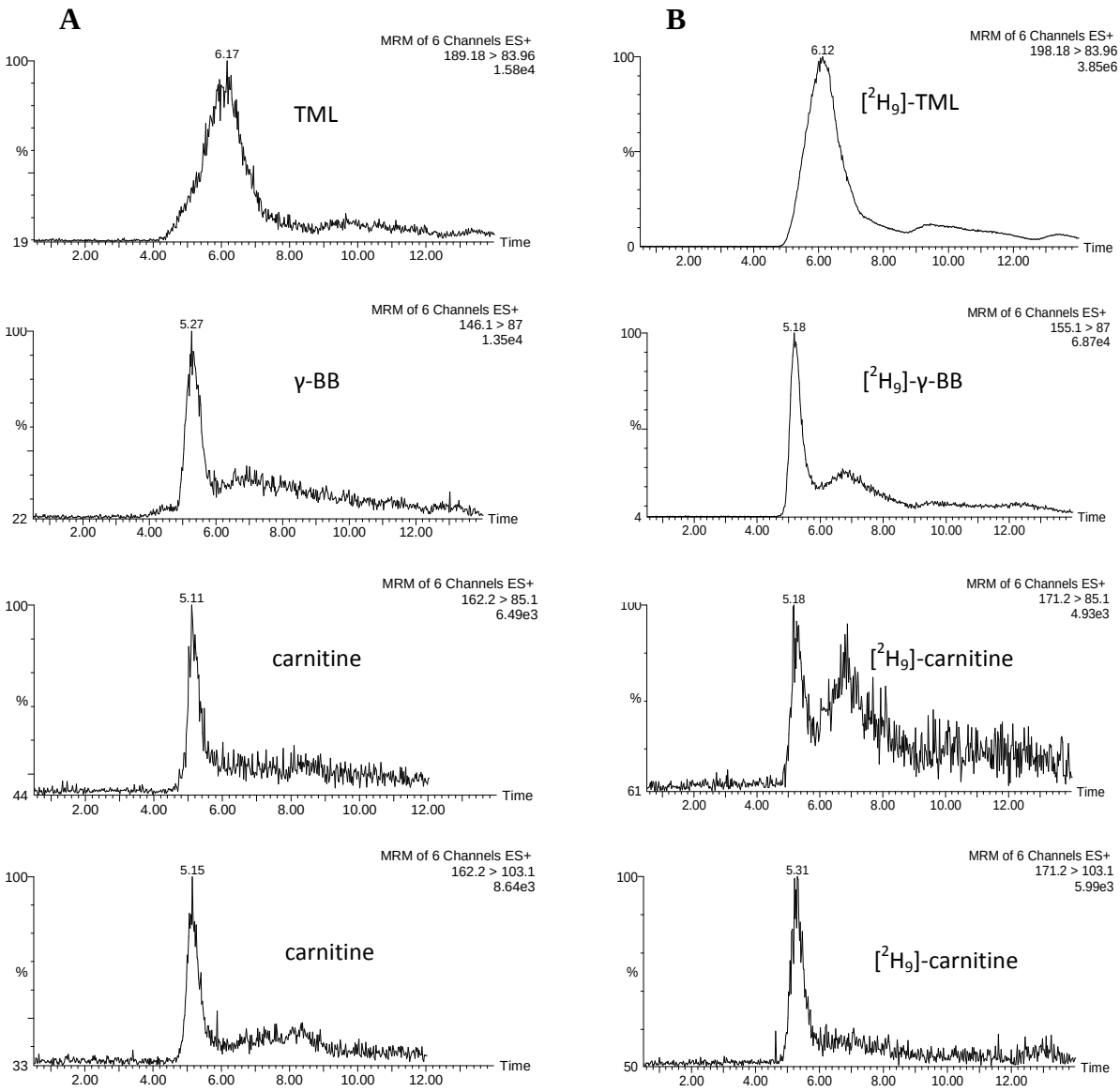


Figure 11: Chromatogrammes LC-ESI-MS/MS d'un extrait obtenu à partir de plantules d'*A. thaliana* de 7 jours cultivées sur du milieu MS (A) et 1 mM de [$^2H_9$]-TLM (B) (d'après Rippa *et al.*, 2012).

Il est montré que *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans* portent également dans leurs séquences des orthologues des gènes de la voie de biosynthèse de la carnitine (Volek *et al.*, 2002). Ceci tend à indiquer, avec les données issues des travaux sur les mammifères et la levure, une bonne conservation des gènes impliqués dans la synthèse de la carnitine entre les espèces.

Une analyse bioinformatique réalisée chez Arabidopsis montre qu'il existe des homologies significatives entre certaines enzymes de plante et les enzymes de mammifères et de levure

pour les étapes 2 et 3 de la voie de biosynthèse (**Figure 8**) (Rippa *et al.*, 2012).

Au contraire, aucune homologie significative de séquence n'est trouvée pour les enzymes des étapes 1 et 4 de la synthèse de carnitine dans la base de données d'Arabidopsis. Ce résultat suggère que les étapes d'hydroxylation pourraient être réalisées par des enzymes différentes chez les plantes. Cependant, la teneur en carnitine de plantules d'Arabidopsis peut être diminuée de 50 % lorsque du THP (3-(2,2,2-trimethylhydrazine) propionate), inhibiteur de la BBD de mammifère (Spaniol *et al.*, 2001), est ajouté au milieu de culture (Rippa *et al.*, 2012). Ce résultat suggère que, malgré l'absence d'homologie de séquence entre les plantes et les mammifères, les sites actifs des enzymes impliquées à ces étapes peuvent partager des structures similaires.

Le génome d'*A. thaliana* code pour sept SHMT et deux thréonines aldolases dont certaines peuvent être envisagées comme candidates potentiellement impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine. De même la superfamille des ALDH, qui est composée de 14 protéines réparties en 9 familles peuvent contenir des membres capables de prendre en charge la conversion de TMABA en γ-BB (Rippa *et al.*, 2012). Les données relatives aux homologies de séquences entre les protéines d'Arabidopsis et humaines ou de levure seront analysées et détaillées dans le troisième chapitre de ce manuscrit.

3. Démarche scientifique

La carnitine joue un rôle fondamental chez les animaux en permettant notamment le transport des AG du cytosol vers les mitochondries lors du catabolisme des lipides dans le métabolisme énergétique. Bien que sa présence et son implication dans le métabolisme lipidique des végétaux soit connues depuis de nombreuses années, son rôle physiologique est encore mal compris.

Dans ce travail de thèse, les connaissances de la voie de biosynthèse de la carnitine animale et de certaines levures ont été utilisées dans une approche de biologie comparée avec les plantes. En effet il a été montré récemment que la plante Arabidopsis utilise des précurseurs similaires aux mammifères et levures pour synthétiser la carnitine ce qui peut laisser supposer une implication d'enzymes comparables. Aussi des protéines d'Arabidopsis homologues aux enzymes animales et de levure sont proposées comme candidats potentiellement impliqués dans la synthèse végétale de la carnitine (Rippa *et al.*, 2012). Des mutants de ces enzymes sont ici recherchés, soit à partir des données bibliographiques, soit à partir de banques de mutants. L'objectif principal de ce travail est donc la recherche de protéines impliquées dans la synthèse végétale de carnitine et l'obtention de mutants présentant des teneurs nulles ou réduites en carnitine afin de disposer d'un nouvel outil d'étude du rôle biologique de la carnitine végétale.

En effet la mise en évidence de protéines impliquées dans la synthèse de carnitine pourra permettre de déterminer les modalités de régulation de cette voie et son implication métabolique et physiologique dans le développement des plantes.

L'organisme choisi pour réaliser cette étude est *Arabidopsis thaliana.* En effet cette plante est considérée comme un organisme végétal modèle (génome entièrement séquencé) et est pratique à utiliser en laboratoire. Ensuite, des travaux antérieurs sur le rôle physiologique de la carnitine ont été menés sur cette plante (Bourdin, 2007; Charrier, 2011). En outre, des collections riches de mutants d'Arabidopsis obtenus par mutagenèse insertionnelle sont disponibles. Enfin, Arabidopsis est une espèce oléagineuse, apparentée au colza, dont le développement précoce est basé sur le métabolisme des réserves lipidiques avant l'établissement complet de la photoautotrophie (Eastmond et Graham, 2001).

Dans un premier temps les protéines candidates à la synthèse de la carnitine chez Arabidopsis seront recherchées et présentées en détail, ainsi que la disponibilité de mutants perte de fonction de ces protéines. Ensuite une analyse de mutants suivant les étapes de la voie de biosynthèse sera décrite avec quantification de teneurs en carnitine, de son précurseur la γ-BB et éventuellement d'esters de carnitine. Enfin une étude détaillée des meilleurs candidats sera menée (phénotype des mutants, analyse fonctionnelle des protéines).

CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

1.1 Bactéries

1.1.1 *Escherichia coli*

La souche commerciale (Promega) d'*Escherichia coli* JM109 choc thermique compétente [*endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17* (rk–, mk+), *relA1, supE44*,-(*lac-proAB*), [*F´ traD36, proAB, laqIqZ-M15*]] est utilisée comme bactérie hôte pour le clonage et l'amplification de plasmides d'une taille inférieure à 10 000 paires de bases (pb). La souche commerciale (Clontech) d'*E. coli* HST08 choc thermique compétente [*F–, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ (lacZYA - argF) U169, Δ (mrr - hsdRMS - mcrBC), ΔmcrA, λ*–] est utilisée comme bactérie hôte pour le clonage et l'amplification de plasmides d'une taille supérieure à 10 000 pb. La souche d'*E. coli* [F$^-$*mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *ara*Δ139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G *fhu*A::*IS2*] du kit 'One Shot® *ccd*B Survival™ 2 T1^R Competent Cells' (Invitrogen) est utilisée pour amplifier le plasmide contenant le gène de *ccdB.*

1.1.2 *Agrobacterium tumefaciens*

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C_{58} (contenant le plasmide pTiC58, Depicker *et al.*, 1980; Wood *et al*., 2001) est utilisée pour la transformation des plantes, elle résiste aux antibiotiques rifampicine et gentamycine.

1.2 Levures *Candida albicans*

Les différentes souches de levure utilisées sont décrites dans le **tableau 5** et proviennent du laboratoire dirigé par le Dr Ben Distel (Université d'Amsterdam, Academic Medical Centre, Department of Medical Biochemistry, Pays-Bas).

Tableau 5: Génotypes des souches de *C. albicans* utilisées (Strijbis *et al*., 2009)

Souche	Description	Génotype
SN76-P1	sauvage	*arg4Δ/ARG4 his1Δ/HIS1 ura3Δ::imm^{434}/ura3Δ::imm^{434}::URA3 iro1Δ::imm^{434}/iro1Δ::imm^{434}::IRO1*
CKS95	*tmabadhΔ/Δ URA^{-}*	*arg4Δ/arg4Δ his1Δ/his1Δ ura3Δ::imm^{434}/ura3Δ::imm^{434} iro1Δ::imm^{434}/iro1Δ::imm^{434} tmabadh Δ::CdARG4/tmabadh Δ::CdHIS1*
CKS96	*tmabadhΔ/Δ URA+*	*arg4Δ/arg4Δ his1Δ/his1Δ ura3Δ::imm^{434}/URA3 iro1Δ::imm^{434}/IRO1 tmabadh Δ::CdARG4/ tmabadhΔ::CdHIS1*
CKS97	*tmabadhΔ/Δ* +TMABADH	*arg4Δ/arg4Δ his1Δ/his1Δ ura3Δ::imm^{434}/URA3*- TMABADH *iro1Δ::imm^{434}/IRO1 tmabadhΔ::CdARG4/tmabadhΔ::CdHIS1*

* *tmabadh*: TMABA(4-trimethylaminobutyraldeyde) déshydrogénase, *URA*: uracile

1.3 Matériel végétal

L'ensemble des études est réalisé avec l'écotype Columbia d'*Arabidopsis thaliana* (Col-0). Les lignées mutantes utilisées au cours de ce travail proviennent de la banque NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre) ou directement d'autres équipes de recherche. Ces lignées et leur provenance sont répertoriées dans les **tableaux 18** et **19** (chapitre III). Dans toutes les expérimentations, les graines du témoin sauvage Col-0 utilisées, proviennent de plantes cultivées en serre dans les mêmes conditions et de manière concomitante aux graines de plantes mutantes auxquelles elles sont comparées.

1.4 Vecteurs de clonage d'ADN

1.4.1 Description des plasmides

- Le plasmide pGEM®-T Easy (Promega) (**Figure 12**) est utilisé pour le clonage de produits d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction). Ce vecteur est fourni sous forme ouverte, coupé par l'enzyme EcoRV au niveau du gène LacZ codant pour la β-galactosidase ce qui permet une sélection par test blanc/bleu des clones ayant incorporé un insert. Des résidus thymidine ajoutés aux extrémités 3' terminales permettent un appariement avec les résidus adénosine débordants ajoutés par la Taq polymérase aux extrémités 3' des amplicons. Le vecteur pGEM®-T Easy contient un gène de résistance à l'ampicilline.

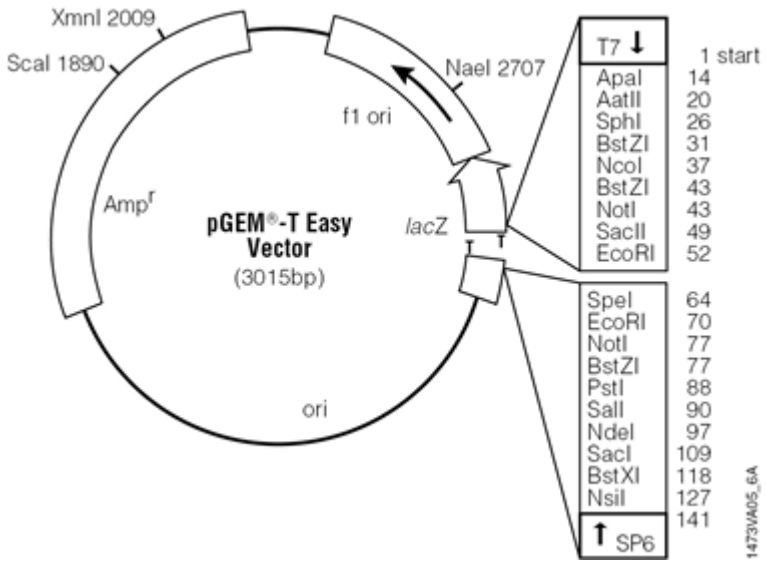


Figure 12: Plasmide pGEM®-T Easy

- Le plasmide pRS300 (**Figure 13**, Prof. D. Weigel, Addgene (http://www.addgene.org/)) contient le précurseur de microARN MIR319a d'*A. thaliana*. Ce plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline.

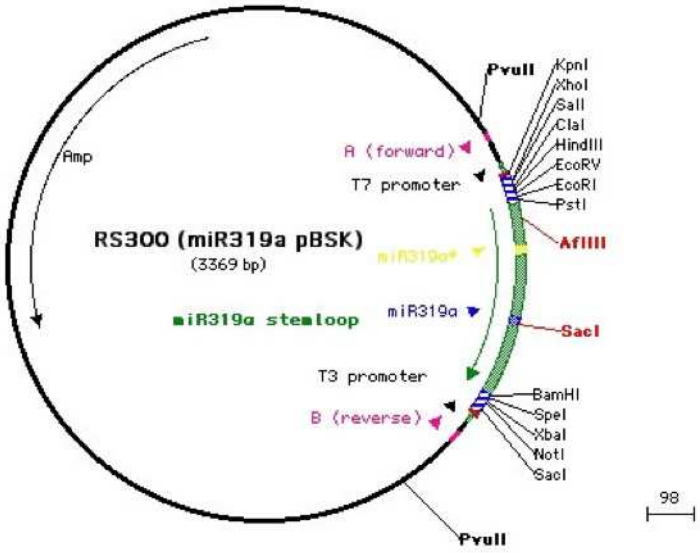


Figure 13: Plasmide pRS300

- Le plasmide pENTR™1A (Invitrogen) (**Figure 14**) est un vecteur de clonage contenant plusieurs sites de restriction enzymatique permettant de construire un vecteur d'entrée utilisable dans un système de clonage Gateway® (recombinaison ultérieure au niveau des sites

attL1 et attL2). Il contient un gène de résistance au chloramphénicol et à la kanamycine. Le gène *ccdB* situé au niveau du site de clonage permet une sélection positive des clones.

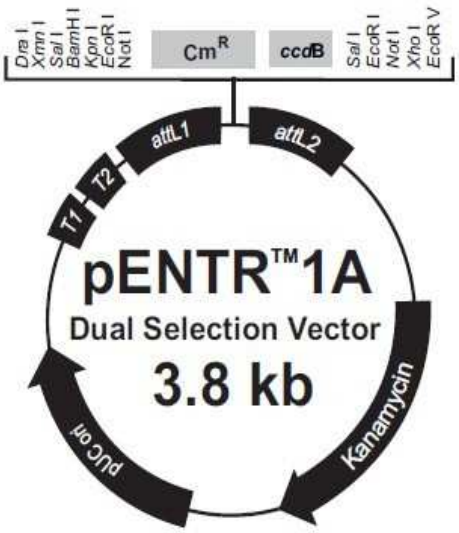


Figure 14: Plasmide pENTR^{TM} 1A

- Le plasmide binaire pB7WG2D.1 (Karimi *et al.*, 2002) (**Figure 15**) provient de la société Lifetechnology. Il est utilisé comme vecteur pour la transformation des plantes d'Arabidopsis. Il contient un gène de résistance à la spectinomycine pour la sélection des clones bactériens et le gène de résistance à l'herbicide Basta et celui de la GFP (Green Fluorescence Proteine) pour la sélection des plantes. Les sites attR1 et attR2 permettent d'échanger des séquences avec celle contenue entre les sites attL1 et attL2 d'un vecteur d'entrée suivant la stratégie Gateway®.

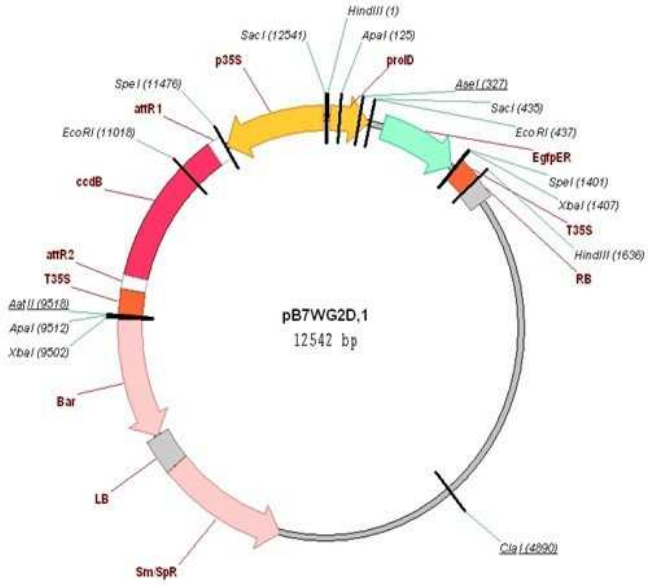


Figure 15: Plasmide binaire pB7WG2D.1

- Le plasmide pLUBP (**Figure 16**) est utilisé comme vecteur pour la transformation de la levure *C. albicans*. Il porte le marqueur de sélection *URA3*, qui permet la synthèse d'uracile (Ramon et Fonzi, 2003).

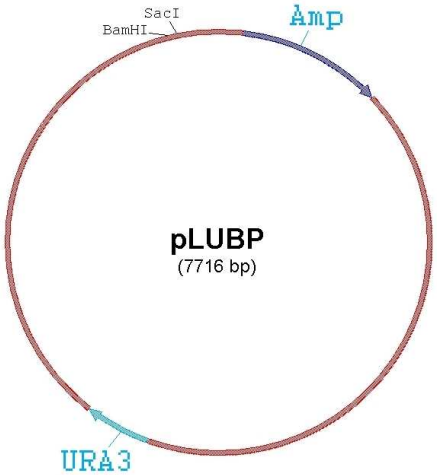


Figure 16: Plasmide pLUBP

- Le plasmide pJB148 (**Figure 17**) contient une cassette d'expression constituée du promoteur, de la séquence codante et du terminateur du gène *TMABADH* de *C. albicans* dans le plasmide pLUBP (Strijbis *et al.*, 2009).

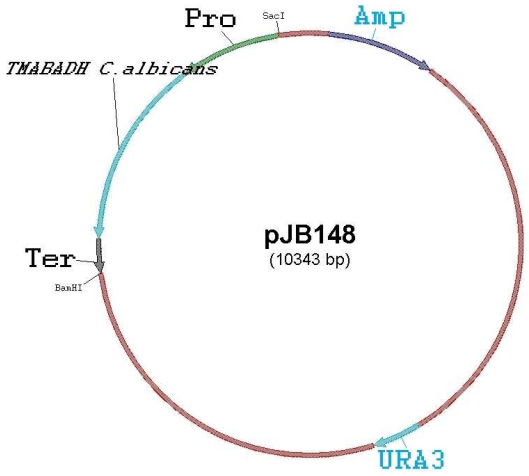


Figure 17: Plasmide pJB148

1.4.2 Antibiotiques sélectifs

Les concentrations utilisées pour la sélection des différents plasmides sont indiquées dans le **tableau 6**.

Tableau 6: Concentration des antibiotiques utilisés.

Antibiotiques	Concentration finale dans le milieu de culture
Ampicilline	100 µg.mL^{-1}
Kanamycine	50 µg.mL^{-1}
Streptomycine	50 µg.mL^{-1}
Spectinomycine	50 µg.mL^{-1}
Rifamycine	50 µg.mL^{-1}
Gentamycine	50 µg.mL^{-1}

2. Technique préparatives

2.1 Culture et transformation des organismes

2.1.1 Culture et transformation des bactéries *E. coli*

Les bactéries *E. coli* sont cultivées à 37°C dans du milieu LB liquide (Luria-Bertani, contenant 10 g.L^{-1} de bactotryptone, 5 g. L^{-1} d'extrait de levure et 10 g.L^{-1} de NaCl) avec une

agitation 180-230 rpm (rotations par minute) pendant 16 h ou sur milieu LB solide dans des boîtes de Petri dans les mêmes conditions sans agitation.

Les bactéries *E. coli* compétentes sont transformées par choc thermique. Deux microlitres de réaction de ligation contenant 5 ng de plasmide circulaire sont ajoutés aux bactéries compétentes et le mélange est mis sur glace pendant 20 à 40 min. Ensuite les bactéries sont transférées à 42°C pendant 45 à 50 s et placées immédiatement sur glace pendant 1 à 2 min. Les bactéries sont reprises dans 1 mL de milieu SOC (0,5% (m/v) d'extrait de levure, 2% (m/v) de tryptone , 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM $MgSO_4$, 20 mM glucose). Elles sont alors incubées 1 h à 37°C sous agitation à 180 rpm, puis étalées sur un milieu LB solide (LB additionné de 10 $g.L^{-1}$ d'agar) contenant l'antibiotique requis pour la sélection. Les boites sont placées à 37°C pendant 16 h. Pour une sélection blanc/bleu, 100 µl de X-gal 2 % (40 $mg.mL^{-1}$) et 40 µl d'IPTG (0,1 M) sont étalées sur les surfaces de milieu LB solide, avant étalement des bactéries puis les boites sont placées à 37°C pendant 16 h.

Le criblage des bactéries recombinantes est effectué par extraction des plasmides, digestion par des enzymes appropriées et vérification de leur profil de restriction. Pour le stockage les bactéries sont cultivées dans du milieu LB sélectif liquide puis conservées à -80°C en présence de glycérol 20 % (v/v).

2.1.2 Culture et transformation des bactéries *A. tumefaciens*

Les cultures liquides de bactéries *A. tumefaciens* C58 se font dans du milieu YEP ($10g.L^{-1}$ de peptone, $10g.L^{-1}$ d'extrait de levure $5g.L^{-1}$ de NaCl) sous agitation (230 rpm) pendant 24 h à 28°C avec les antibiotiques rifamycine et gentamycine aux concentrations indiquées dans le **tableau 6**. Les cultures solides se font dans le même milieu auquel sont ajoutés 12 $g.L^{-1}$ d'agar.

Afin de préparer des *A. tumefaciens* électrocompétentes, une préculture est réalisée dans 2 mL de milieu LB et placée à 28°C jusqu'à saturation (soit environ 36 h). Ensuite deux cultures sont réalisées dans 300 mL de LB en présence d'antibiotiques sélectifs jusqu'à obtenir une DO de 0,5-0,6. Ensuite, les bactéries sont refroidies dans la glace pendant 15 à 30 min, puis centrifugées à 2 830 g pendant 15 min. Le culot bactérien obtenu est ensuite repris dans 250 ml d'une solution à 1mM d'HEPES froide (4-(2-Hydroxyéthyl)-1-Pipérazineethane-sulfonique) et centrifugé 10 min à 4 420 g. Il est ensuite resuspendu dans 25 mL de la même solution d'Hépès froide puis centrifugé pendant 10 min à 8 670 g à 4°C. Cette étape est répétée une deuxième fois, puis les bactéries sont centrifugées dans les mêmes conditions et reprises dans une solution de glycérol 10 % (v/v). Enfin, le culot bactérien est repris dans 1mL de la solution de glycérol à 10 % et aliquoté par fractions de 40 µl congelées à -80°C pour un usage

ultérieur.

Pour la transformation, 40 µL de bactéries *A. tumefaciens* électrocompétentes sont mélangés avec 1 µL de solution de plasmide à la concentration de 30 ng.µL^{-1}. Le mélange est placé dans une cuvette d'électroporation (Gene Pulser Cuvette, Bio Rad) (voltage: 2,5 kV, capacité: 40 µF, résistance: 192 Ω). Le temps de décharge est de 10 ms. Immédiatement après l'induction électrique, 900 µL de YEP sont ajoutés au mélange qui est cultivé à 28°C durant 1 h avant étalement des agrobactéries sur des boîtes de milieu de culture sélectif.

2.1.3 Culture et transformation des levures

Le milieu de croissance non sélectif pour le maintien des souches de levure est le YPD (Yeast Peptone Dextrose, Sigma-Aldrich) composé de 10 g.L^{-1} d'extrait de levure, 20 g.L^{-1} de peptone et 3 g.L^{-1} de glucose. La sélection pour les transformations dans le cadre des expériences de complémentation est effectuée sur un milieu minimal YNB sans acide aminé (Yeast Nitrogen Base without amino acid, Sigma-Aldrich), composé de 6,7 g.L^{-1} de milieu azoté sans acide aminé, 0,72 g.L^{-1} d'un mélange d'acides aminés essentiels dépourvu d'uracile (amino acid supplement mixture CMS (MP biomédical)). Le milieu YNB + glucose contient 20 g.L^{-1} de glucose comme source de carbone. Le milieu oléate contient un mélange d'acide oléique et de Tween-80 (0,12 %/0,2 %, m/v) en remplacement du glucose. Les milieux solides sont additionnés de 20 g.L^{-1} d'agarose.

Pour préparer les levures compétentes, 15 ml de milieu liquide YPD sont inoculés avec 1 colonie de levure. L'inoculum est ensuite cultivé à 30°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à la phase stationnaire (16 h). La culture est diluée dans du milieu YPD afin d'obtenir une DO de 0,3 à 600 nm puis cultivée 4 h à 30°C sous agitation (200 rpm). Les levures sont récoltées par centrifugation (1000 g, 5 min, à température ambiante). Le culot est lavé dans 50 mL d'eau stérile puis centrifugé à nouveau (1000 g, 5 min, à température ambiante). Le culot est enfin repris dans 1,5 mL de tampon LiAc-sol (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,5 et 100 mM acétate de lithium, pH 7,5) préparé extemporanément. Des fractions de 100 µL sont mises à -20°C pendant 30 min puis conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Pour la transformation des levures, 1 µg de plasmide est ajouté à 100 ng d'ADN de sperme de saumon préalablement dénaturé 5 min à 95°C (Salmon Testes DNA, Sigma- Aldrich). Une fraction de 100 µL de levures compétentes et 600 µL de PEG/LiAc-sol (50 % PEG 4000 dans LiAc-sol) sont additionnés au mélange et mis à incuber sous agitation (30°C, 16 h, 200 rpm). Un choc thermique de 15 min à 44°C est appliqué au mélange de transformation qui est ensuite centrifugé (3 000 g, 5 min, à température ambiante) suivant la méthode décrite par Walther et

Wendland en 2003. Le culot de levures est repris dans 500 µL d'eau MilliQ stérile puis 100 µL sont étalés sur milieu de croissance sélectif. Les boites sont incubées à 30°C jusqu'à l'obtention de colonies (environ 48 h).

2.1.4 Culture et transformation des plantes

2.1.4.1 Culture des plantes *in vitro*

La stérilisation des graines s'effectue sous hotte à flux laminaire horizontal. Les graines sont traitées pendant 3 min avec 1 mL d'éthanol aqueux 70 % contenant 0,05 % (m/v) de sodium dodécyl sulfate (SDS). Elles sont ensuite rincées avec 1 mL d'éthanol 95 % pendant 1 min, et mises à sécher sous hotte sur du papier Whatman (3 MM) préalablement autoclavé.

Les graines sont réparties en boîtes de pétri sur le milieu M&S (Murashige and Skoog basal medium, Réf M5524, Sigma-Aldrich, Murashige et Skoog, 1962) en conditions stériles, puis vernalisées à 4°C pendant 4 jours. Les boites sont placées en armoires phytotroniques avec une photopériode de 16 h, un éclairement de 150 µmol de photons.m^{-2}.s^{-1}, une température de 24°C et une hygrométrie de 70 %.

2.1.4.2 Culture des plantes en serre

Des graines sont disposées sur du terreau (Universal Mix Lignum, TERRA BRILL Profiline) dans des pots de 10 cm de côté, puis vernalisées à 4°C pendant 4 jours. Les plantes sont ensuite cultivées en serre avec une photopériode de 16 h, sous une lumière de 400 µmol de photons.m^{-2}.s^{-1}, une température de 24°C et un taux d'hygrométrie de 60 %. Les graines sont récoltées à maturité complète lorsque les siliques sont déhiscentes.

2.1.4.3 Transformation des plantes

La transformation d'*A. thaliana* s'effectue selon la méthode décrite par Clough et Bent (1998), par immersion des inflorescences dans une solution d'*A. tumefaciens*. Une pré-culture d'une nuit de bactéries *A. tumefaciens*, transformées avec le plasmide d'interêt, est réalisée par inoculation d'une colonie dans 5 ml de milieu YEP sélectif. Les bactéries sont ensuite remises en culture dans 300 ml de milieu YEP sélectif. Après incubation sous agitation durant une nuit à 28°C (jusqu'à atteindre une DO de 0,8-1 à 600 nm), la culture est centrifugée à 2 380 g pendant 10 min. Le culot bactérien est repris dans 300 mL d'une solution contenant 1 % de saccharose (p/v) et du Silwett L77 (OSi Crompton Europe) à 0,05 % (v/v). Les inflorescences des plantes âgées de 3 à 4 semaines sont alors mises en contact avec cette solution pendant 2 minutes par

immersion, placées ensuite sous cloche, une nuit dans la serre, puis cultivées en conditions normales jusqu'à obtention des graines.

2.2 Techniques d'extraction d'acides nucléiques

2.2.1 Extraction d'ADN plasmidique

Les extractions d'ADN plasmidique sont réalisées à partir de 5 mL d'une culture liquide d'*E. coli* à l'aide du kit « QIAprep® Spin Miniprep » (QIAGEN) d'après les instructions du fabricant. Cette extraction est basée sur une lyse alcaline des bactéries puis une purification des plasmides sur colonne.

2.2.2 Extraction rapide d'ADN génomique de plantes

Afin d'extraire l'ADN génomique en vue de la réalisation de génotypage par PCR, une jeune feuille de plante est broyée à l'aide d'un cône de broyage dans un tube eppendorf. Quatre cents (400 µL) de tampon d'extration sont ajoutés (200 mM Tris HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS). Le broyat est ensuite centrifugé 1 min à 15 700 g. Un volume de 300 µl de surnageant est mélangé à 300 µl d'isopropanol. Après 2 min à temperature ambiante, le mélange est centrifugé 5 min à 15 700 g. Le culot est alors séché à l'étuve à 37°C puis repris dans 100 µl de tampon TE (10 mM de Tris et 1 mM d'EDTA). L'ADN est conservé à -20°C.

2.2.3 Extraction d'ARN totaux de plantes

2.2.3.1 Extraction classique d'ARN totaux de plantes

L'eau utilisée pour la préparation des ARN est de l'eau préalablement traitée avec du DEPC (Diéthyl Pyrocarbonate) à 0,1 % (v/v) pendant 1 nuit pour supprimer d'éventuelles activités RNases. Elle est autoclavée pendant 40 min à 120°C, à la pression de 1 bar avant d'être utilisée.

Le matériel végétal (maximum 1 g) préalablement prélevé et conservé à -80°C est broyé dans de l'azote liquide et le broyat est repris dans 900 µl de tampon d'extraction (25 mM Tris-HCl pH8, 25 mM EDTA, 75 mM NaCl, 1 % SDS (m/v)). Puis sont ajoutés 900 ml de phénol-chloroforme-isoamylalcool (50/24/1, v/v/v). Après une centrifugation de 20 min à 15 700 g et à 4°C, la phase aqueuse est recueillie et mélangée à 900 µl de phénol-chloroforme-isoamylalcool (25/24/1, v/v/v). La phase aqueuse après une centrifugation dans les mêmes conditions est mélangée avec 900 µl de chloroforme-isoamyl alcool (24/1, v/v)

et centrifugée à 15 700 g à 4°C pendant 20 min. Un quart de volume de LiCl (chlorure de lithium) 10 M est ajouté à la phase aqueuse et mis à précipiter pendant une nuit à 4°C.

L'échantillon est ensuite centrifugé à 15 700 g pendant 15 min à 4°C. Le culot d'ARN est alors lavé avec 500 µl de LiCl 2 M puis centrifugé dans les mêmes conditions. Le culot est dissout dans 200 µl de TE (250 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM EDTA) avant d'être précipité avec 400 µl d'éthanol à 100 % et 20 µl de NaoAc 3M pH 5,2 à -20°C pendant une nuit. L'échantillon est à nouveau centrifugé à 15 700 g pendant 15 min à 4°C. Le culot d'ARN est lavé à l'éthanol à 80 %, séché sous vide, repris dans 200 µl d'eau DEPC et placé 1 min à 55°C puis conservé à -80°C pour un usage ultérieur.

Les ARN ainsi extraits sont quantifiés au spectrophotomètre. Une unité de DO_{260} d'une solution d'ARN correspond à une concentration de 40 $\mu g.mL^{-1}$ de solution. Le rapport DO_{260} /DO_{280} permet de mesurer le degré de pureté de l'échantillon, il doit être compris entre 1,8 et 2.

2.2.3.2 Extraction rapide d'ARN totaux de plantes

Les extractions rapides d'ARN totaux de plantes sont réalisées à partir de 100 mg de matériel végétal à l'aide du kit « RNeasy® plant Mini Kit » (QIAGEN) d'après les instructions du fabricant. Cette extraction permet d'extraire les ARN totaux d'Arabidopsis en 4 h.

2.3 Techniques d'amplification par PCR

2.3.1 Amorces utilisées pour les réactions PCR

Les amorces utilisées pour les réactions de PCR sont répertoriées dans le **tableau 7**.

Tableau 7 : Liste des amorces PCR utilisées.

Nom	Séquence 5'-3'
ZY003	ctcgtcgatcttagacccat
ZY004	actcaggagatgtcacgaac
ZY009	ggatccgtaaatcctatga
ZY010	agatcttgattttgttagtataa
ZY013	gagagatcttatggcgattacg
ZY014	tatcggtacctagtgtttgtct
ZY015	catggtggtacctgaagggg
ZY016	ctggaaccggtgaaatggaa
ZY023	ggtgcaccacgaatccacgat
ZY024	gcacaaagatttgaacagacagc
SR68	atgaagattaaggtcgtggcac
SR69	gtttttatccgagtttgaagaggc
SR116	ggaccaaagacttcctctctccag
SR119	gcaggtgctccactggcatc
SR124	agacagcctcgtataggatgtatata
SR125	cgtagttccgataacgatagattgaat
SR128	caggggacttgagaactacttgagt
SR129	tcaatcatcattcgtgtagagagcttca
SR132	gagacctgttgatcaccaagaa
SR133	ggagctttgacatctctgact
LB1a	tggttcacgtagtgggccatcg
LB2	gcttcctattatatcttcccaaattaccaataca
pSKTAIL-L3	atacgacggatcgtaatttgtcg
AY093071_RT_fwd	gatcttgcatggtggttcccga
AY093071_RT_rev	aagcacaaagatttgaacagacagc
AF370333_RT_fwd	tgttctttgtggaggagttcgtc
AF370333_RT_rev	gaagggtctcttgctttattg
amiRNA$_1$	gattagaggtttaccgcactcaatctctctttgtattcc
amiRNA$_2$	gattgagtgcggtaaacctctaatcaaagagaatcaatga
amiRNA$_3$	gattaagtgcggtaatcctctattcacaggtcgtgatatg
amiRNA$_4$	gaatagaggattaccgcacttaatctacatatatattcct
amiRNA$_5$	gataatgatagggcttttagccctctctctttgtattcc
amiRNA$_6$	gagggctaaaagccctatcattatcaaagagaatcaatga
amiRNA$_7$	gaggactaaaagcccaatcattttcacaggtcgtgatatg
amiRNA$_8$	gaaaatgattgggcttttagtcctctacatatatattcct

Tableau 7 : Liste des amorces PCR utilisées (suite).

Nom	Séquence 5'-3'
PriA	ctgcaaggcgattaagttgggtaac
PriB	gcggataacaatttcacacaggaaacag

2.3.2 PCR de génotypage

Le génotypage de plantes contenant des insertions d'ADN-T se fait avec 3 amorces PCR : deux situées de part et d'autre de l'insertion, une spécifique de la bordure gauche de l'ADN-T. Le mélange pour la réaction de PCR est réalisé selon les instructions du kit commercial Taq polymérase (Sigma-Aldrich), soit pour un volume réactionnel de 50 µL: 5µL de tampon 10X, 1µL de dNTP 10 mM, 0,5 µL de chaque amorce à 20 µM,0,5 µL de Taq polymérase, 1µl de matrice d'ADN (obtenu par extraction rapide d'ADN génomique) et de l'eau. Une première phase de dénaturation de l'ADN est réalisée à 94°C pendant 2 minutes suivie de trente cycles, composés d'une phase de dénaturation à 94°C pendant 1 min, d'une phase d'hybridation de 2 min à une température dépendant de la nature des amorces utilisées et d'une phase d'élongation de 3 min à 72°C.

2.3.3 Amplification par PCR de gènes en vue de constructions plasmidiques

Les PCR effectuées dans le but de construire des vecteurs de clonage sont réalisées à l'aide du kit commercial *Pfx50*™ DNA Polymerase (Invitrogen^{TM}) du fait des propriétés de fidélité de l'enzyme utilisée. Le mélange réactionnel est réalisé selon les instructions du fabricant du kit. Les amorces adéquates sont mises en présence de 10 ng à 1 µg de matrice d'ADN, 1,5 µL de mélange équimolaire de dNTP (10 mM), 5 unités d'ADN polymérase et 5 µL de tampon 10x dans 50 µL de tampon réactionnel. Le programme de PCR débute par une dénaturation pendant 2 min à 94°C, puis est suivi par 35 cycles d'une dénaturation de 15 s à 94°C, d'une hybridation de 10 à 30 s allant de 60 à 68°C suivant la nature des amorces et une élongation de 30 à 60 s à 68°C. La réaction se termine par 5 min d'élongation à 68°C.

2.3.4 Amplification par PCR de gènes en vue de la réalisation de sondes pour les Northern Blots

Les sondes sont amplifiées par PCR à l'aide du kit commercial Taq polymérase, (Sigma-Aldrich) selon les recommandations du fournisseur. Les conditions réactionnelles sont les mêmes que celles décrites au paragraphe 2.3.2.

2.3.5 RT-PCR

Les réactions de RT-PCR sont réalisées à l'aide du kit Titan One Tube RT-PCR Kit (Roche) en suivant les instructions du fabriquant. Les amorces préparé à la concentration de 400 nM, sont mises en présence d'1 µg d'ARN (Dnase Treated), 0,8 mM de dNTP, 5 mM de dithiothréitol (DTT), 5 unités d'inhibiteur de RNase et 1 µL du mélange de rétro-transcriptase et ADN polymérase (AMV et Expand High Fidelity) dans 50 µL de tampon réactionnel. Après une incubation à 50°C pendant 30 min, le programme de PCR débute par une dénaturation pendant 2 min à 94°C, puis pendant 10 cycles, une dénaturation de 30 s à 94°C, une hybridation de 30 s à 57°C, une élongation de 45 s à 72°C. Ceci est suivi de 30 cycles identiques aux précédents mais comportant un incrément de 5 s pour chaque cycle d'élongation. La réaction se termine par 7 min de temps d'élongation à 72°C. Pour une RT-PCR quantitative, des prélèvements de 5 uL sont effectués tous les 5 cycles au cours de la réaction après les 15 première cycles d'amplification PCR.

2.3.6 Amplification des précurseurs d'*amiRNA* par PCR

Les séquences des *amiRNA* ciblant le gène *ALDH10A9* sont indiquées dans le **tableau 8** et ont été choisies à l'aide du site http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi suivant la technique mise au point par l'équipe du Prof. D. Weigel (Ossowski *et al.*, 2008).

Tableau 8: Séquence des *amiRNA1* et *amiRNA2*

Nom	Séquence (5'-3')
amiRNA1	TAATGATAGGGCTTTTAGCCC
amiRNA2	TTAGAGGTTTACCGCACTCAA

Les précurseurs d'*amiRNA* sont amplifiés à partir du précurseur MIR319a contenu dans le plasmide pRS300 (**Figure 13**) par une technique de PCR chevauchante selon le schéma décrit sur la **figure 18** (Schwab *et al.*, 2010).

Une première étape de trois PCR indépendantes utilisant des amorces inverses complémentaires permet une amplification des fragments a (amorces PriA et amiRNA$_4$), b (amorces amiRNA$_2$ et amiRNA$_3$) et c (amorces amiRNA$_1$ et PriB). Une seconde étape utilisant les amorces PriA et PriB sur un mélange des matrices a, b et c permet d'amplifier le précurseur complet d. De la même manière le précurseur d'*amiRNA2* est obtenu par une première étape de PCR amplifiant les fragments a (amorces PriA et amiRNA$_8$), b (amorces amiRNA$_6$ et amiRNA$_7$)

et c (amorces amiRNA$_5$ et PriB) et une seconde amplification utilisant les amorces PriA et PriB (**Figure 18**).

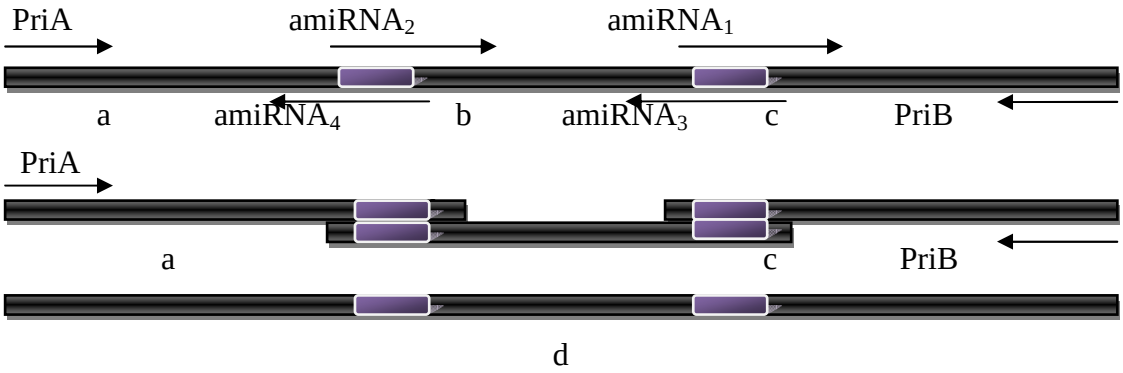


Figure 18: réactions PCR permettant d'amplifier le précurseur de l'*amiRNA1*. Les zones de complémentarités des amorces sont indiquées en violet.

Les conditions de réactions PCR sont celles décrites au paragraphe 2.3.3.

2 .4 Réactions de ligation

Les réactions de ligation pour la construction de plasmides réalisées à l'aide de la T4 DNA ligase (Roche) se font dans un volume final réactionnel de 20 µL en suivant les instructions du fournisseur. Les ADN (ratio molaire vecteur:insert de 1:1 ou 1:3) sont mis en présence de la ligase (1U par µg de plasmide) et du tampon de ligation (10x). Le mélange réactionnel est ensuite incubé au moins 16 h à 4°C. Les clonages utilisant la technologie Gateway® se font à l'aide du kit Gateway® LR Clonase™ II Enzymes Mix (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur pendant 1 h à 25°C en utilisant 50 à 150 ng de vecteur d'entrée et 150 ng de vecteur de destination dans un volume réactionnel de 10 µl. La réaction est ensuite arrêtée en ajoutant 1 µl de protéinase K.

2.5 Réactions de digestion enzymatique

Dans un volume réactionnel de 20 µL, les plasmides (environ 3 µg) sont mis en présence des enzymes de restriction choisies (2 U par µg de plasmide) dans le tampon approprié (New England Biolabs) et incubés entre 2 h et 4 h à la température adéquate selon l'enzyme.

2.6 Extraction des carnitines et de la γ-BB

2.6.1 Extraction de la carnitine libre, des acyl-carnitines et de la γ-BB

La carnitine libre, les acyl-carnitines et la γ-butyrobétaïne contenues dans les plantes d'*A. thaliana* sont extraites à partir du même échantillon d'après la méthode mise au point dans le laboratoire et optimisée par rapport à Bourdin *et al.*, 2007. Les échantillons végétaux (environ 100 mg), préalablement conservés à -80°C, sont broyés dans l'azote liquide et repris dans 800 µL d'un mélange méthanol/eau (8/2; v/v). Au moment de l'extraction, des standards internes sont ajoutés à raison de 5 $ng.mg^{-1}$ MS de carnitine deuterée (L-Carnitine-methyl-d_3 hydrochloride, Sigma-Aldrich) et 5 $pg.mg^{-1}$ de MS de [^{13}C]palmitoyl-carnitine (Palmitoyl-1,2,3,4-$^{13}C_4$-L-carnitine hydrochloride Sigma-Aldrich). Ces standards servent de références pour le calcul des teneurs en carnitine et acyl-carnitines endogènes. L'extrait est ensuite traité aux ultrasons à 90 Watts pendant 20 secondes puis centrifugé à 15 700 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est prélevé et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Le surnageant récolté est séché sous flux d'azote à 50°C et conservé à -20°C.

Au moment de l'analyse, l'échantillon est repris dans un mélange méthanol/eau (8/2, v/v), le volume de reprise étant calculé en fonction de la masse de l'échantillon de départ avec un ratio de 1/1 (m/v). Une homogénéisation au vortex permet de reprendre toute la matière. Une centrifugation (15 700 g, 10 min à 4°C) est effectuée afin de d'éliminer toute particule solide. L'échantillon est ensuite conservé sur la glace en attente de l'analyse. La glycine bétaïne est dosée par LC-ESI-MS/MS sur ce type d'extrait en parallèle des carnitines.

2.6.2 Extraction de la carnitine estérifiée

Pour chaque matériel végétal analysé, une extraction est réalisée sur un second lot du même échantillon, incluant une étape de saponification afin de libérer et quantifier la fraction de carnitine estérifiée qui n'est pas prise en compte dans le dosage des acyl-carnitines. En effet, nos analyses en spectrométrie de masse ne concernent pas toutes les acyl-carnitines correspondant à l'ensemble des AG et la carnitine peut-être liée à d'autres acides organiques. Pour cela, la procédure d'extraction mise en place est comparable à celle décrite au paragraphe 2.6.1 mais (1) le mélange méthanol/eau est remplacé par un mélange aqueux de méthanol/KOH (8/2, v/v) dont la concentration finale en KOH est de 0,1 M, (2) l'échantillon est chauffé à 65°C pendant 30 min avant la première centrifugation et (3) au moment de l'analyse, l'échantillon est repris dans un mélange méthanol/eau (8/2, v/v) auquel sont ajoutés 7 µL d'HCl 12 M pour neutraliser le KOH.

Plusieurs expérimentations, incluant un troisième lot soumis aussi à l'extraction/saponification, mais auquel a été ajouté de l'acétyl-carnitine en quantité connue, a permis d'estimer le rendement d'hydrolyse de nos conditions de saponification à 95-100 %.

3. Techniques analytiques

3.1 Analyse par PCR quantitative en temps réel (Real-time qPCR)

Les taux de transcrits sont évalués par PCR quantitative en temps réel, comme décrit par Gutierrez *et al.*, (2012), avec un LightCycler 480 (Roche) sur des plaques de 384 puits. Le milieu réactionnel nécessaire à la quantification des transcrits contient 5 µL de master-mix LightCycler 480 SYBR Green I (Roche), 2 µL d'ADNc, les amorces sens et antisens à 0,5 mM chacune, dans un volume final de 10 µL. Les amorces sont choisies en utilisant le logiciel en ligne PRIMER3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) et leur courbe de fusion est déterminée comme décrit par Louvet *et al.* (2006) (**Tableau 9**).

Tableau 9: Liste des amorces utilisées en qPCR

Nom	Séquence 5'-3'
10A8-Fwd	AGGACGAGGCAATTGAGCTA
10A8-Rev	TCCAAGTTCTCGTCCAAACC
10A9-Fwd	AGGCAATTCAGCTTGCAAAT
10A9-Rev	CTGAGAGCAGTTGACCCACA
AT4g26410-Fwd	TTTCCAATTGAATCGCAGTG
AT4g26410-Rev	AGGAAGCAGGCAAAAACACA
PEX4-Fwd	CTTGGACGCTTCAGTCTGTG
PEX4-Rev	TGAACCCTCTCACATCACCA

Les valeurs de cycle thresholds (CT) ou cycle seuil, pour chaque échantillon sont acquises avec le logiciel LightCycler 480 (Roche). Le CT est le nombre de cycles à partir duquel le produit PCR est détectable par fluorescence. Le moment d'apparition de ce signal seuil de fluorescence est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. Cette valeur est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de façon absolue ou relative. Les données de PCR quantitative en temps réel sont normalisées à l'aide des gènes de référence *AT4g26410* et *PEX4*, pour réaliser une quantification relative. Ces derniers sont préalablement validés par le logiciel GeNorm et présentent des niveaux d'expression les plus stables dans nos conditions expérimentales quel que soit le génotype. Enfin, le calcul de l'expression relative des gènes cibles est effectuée, selon la formule suivante:

$$\frac{E_T^{CT}}{E_R^{CT}}$$

T: gène cible
R: gène de référence
E : efficacité du couple d'amorces (T ou R)
CT: crossing thresholds

3.2 Techniques d'analyse d'acides nucléiques

3.2.1 Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification par PCR, les plasmides ou les produits de digestion enzymatique sont vérifiés sur gel d'agarose d'une concentration allant de 0,8 à 2 % (m/v) en fonction de la taille des fragments. Le gel est préparé dans du tampon TAE 0,5X (20 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA pH 8) auquel est ajouté du bromure d'éthidium (BET) à la concentration finale de 0,15 µg.mL^{-1}. Avant d'être chargés, les échantillons sont additionnés de tampon de charge « Gel Loading Dye blue 6x » (BioLabs). L'ensemble est mis à migrer sous une tension de 100 V, dans la solution de tampon de migration TAE 0,5X. La taille et la quantité d'ADN peuvent être estimés par comparaison avec un marqueur de taille (Smart Ladder, Eurogentec). Dans le cadre d'un clonage ou de l'obtention d'une sonde pour les Northern Blots, les fragments d'ADN sont purifiés à partir du gel grâce au kit commercial « Montage Gel extraction kit » (Millipore). Dans ce cas le gel est préparé à partir du tampon TAE 1X modifié suivant les recommandations du fabricant.

3.2.2 Analyse de l'expression des gènes par Northern Blot

3.2.2.1 Séparation des ARN par électrophorèse et transfert sur membrane

Quinze µg d'ARN sont séchés sous vide et repris dans 10 µL de tampon dénaturant (20 mM MOPS (acide 3-[*N*-morpholino] propanesulfonique), 50 mM d'acétate de sodium (NaAc), 10 mM EDTA ajusté à pH 7), 5 % (v/v) formaldéhyde, 50 % (v/v) formamide). Les ARN et le marqueur de taille (RNA Marker, Sigma-Aldrich) sont dénaturés respectivement 10 et 5 min à 65°C. Au terme de la dénaturation, le mélange est placé dans la glace puis additionné de tampon de charge (RNA sample loading buffer (Sigma-Aldrich)). Les échantillons sont déposés sur gel d'agarose à 1,5 % (m/v) dans du tampon MOPS contenant 5 % (v/v) de formaldéhyde aqueux à 37 % (v/v). Les ARN migrent sous une tension de 80 V dans le tampon de migration MOPS et

sont visualisés sous UV.

Le transfert des ARN se fait par capillarité sur une membrane de nylon (Hybond N+, Amersham) à l'aide d'un tampon phosphate de sodium ($NaPO_4$ 25 mM, pH 6,5) pendant une nuit. La membrane est ensuite séchée à 80°C pendant 30 minutes pour fixer les ARN.

3.2.2.2 Préparation de la sonde radioactive, hybridation et lavages de la membrane

Les sondes utilisées pour détecter les ARNm des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* sont amplifiées par PCR à l'aide des amorces AY093071_RT_fwd / ZY024 et AF370333_RT_fwd / ZY014 respectivement, sur des plasmides contenant les séquences correspondant aux ADNc.

La préhybridation de la membrane est effectuée à 65°C dans une solution d'hybridation (1 M Na_2HPO_4, 0,5 M EDTA, 20 % (m/v) SDS, 1 % (m/v) de sérum albumine bovine) sous agitation pendant 2 heures. Les sondes obtenues après purification sur gel d'agarose sont directement utilisées pour le marquage radioactif. Le marquage des sondes au dCTP^{32}P (10 mCi.mL^{-1}) est réalisé au moyen du «Random Primed DNA Labelling Kit» en suivant le protocole décrit par le fabricant (Roche). La réaction est catalysée par l'ADN polymérase I d'*E. coli* (Klenow) à partir d'amorces aléatoires de 6 pb (hexanucléotides). Pour cela la sonde (50 à 100 ng d'ADNc) est dénaturée 10 min à 100°C avant d'être incubée 30 min à 37°C dans un mélange d'hexanucléotides, de dNTPs, de Klenow, et de 5 µCi de dCT^{32}P. La sonde radioactive est ensuite purifiée sur colonne (G-50 micro columns, Amersham) par 2 rinçages avec du tampon NTE (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,5, 1 mM EDTA), dénaturée 10 min à 100°C puis refroidie dans la glace avant d'être ajoutée au tampon d'hybridation.

Les membranes préhybridées sont placées dans du tampon d'hybridation additionné de la sonde radioactive. Après une nuit d'hybridation à 65°C, les membranes sont rincées dans des conditions de stringences de plus en plus élevées. Deux rinçages de 10 min à température ambiante dans 40 mM Na_2HPO_4, 1 mM EDTA et 1 % (m/v) SDS sont suivis de deux rinçages de 10 min à 55°C dans 20 mM Na_2HPO_4, 1 mM EDTA et 1 % (m/v) SDS. Les membranes peuvent être déshybridées 20 min à 70°C dans du tampon de déshybridation (2 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA et 0,1 % (m/v) SDS) pour être réhybridées avec une sonde différente.

3.2.2.3 Détection du signal

Le signal est révélé par exposition des membranes sur un écran au phosphore (Phosphor Screen, Packard) pendant le temps adéquat. La lecture de l'écran est effectuée par un analyseur d'image Packard Cyclone™ Storage Phosphor System (PhosphorImager, Packard Instrument

Company).

3.2.2.4 Quantification de l'expression des gènes

La quantification de l'expression des gènes est faite à l'aide du logiciel OptiQuant^{R}. L'image du gel dénaturant avant transfert est également traitée avec ce logiciel afin d'appliquer si nécessaire un facteur correctif déterminé par l'intensité de la bande correspondant à l'ARNr18S.

3.3 Analyse et quantification des carnitines et γ-butyrobétaïne (γ-BB) par LC-ESI-MS/MS

Les analyses de carnitines et de γ-BB sont réalisées par un système analytique de couplage issu de la société Agilent Technologie (Modèle Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS Systems) et dont la méthode analytique a été mise au point au sein du laboratoire.

La séparation chromatographique est effectuée à l'aide d'une chaine HPLC Agilent 1290, munie d'une pompe binaire, d'un injecteur automatique refroidi par effet Peltier. Une colonne à interactions hydrophiles de type Hilic (Kinetex 2,6µm Hilic 100A, 150 mm x 3,0 mm, rèf. 5568-159, Phenomenex) est utilisée pour la séparation de molécules polaires. Vingt µL de l'échantillon à analyser sont injectés vers la colonne (maintenue à 30°C) avec un débit constant de 0,7 ml/min et une pression maximale de 1 000 bars. Un gradient d'élution avec deux phases mobiles est utilisé: le solvant A est de l'eau additionnée d'acétate d'ammonium à 10 mM, et le solvant B se compose de 100 % d'acétonitrile. Le gradient démarre à 98 % de solvant B pendant 1,67 min, suivi d'une diminution progressive à 40 % en 23,33 min. Le solvant B est maintenu à 40 % pendant 12 min pour laver la colonne. Enfin, un post-time de 15 min à 98 % de solvant B est intégré à la méthode pour reéquilibrer la colonne.

La sortie de colonne est couplée à un détecteur de type spectromètre de masse triple quadripolaire (Agilent 6460), équipé d'une source d'ionisation electrospray associée au module complémentaire Jetstream. Les paramètres de la source ont été optimisés et définis comme suit (**Tableau 10**):

Tableau 10: Paramètres de la source d'ionisation électrospray.

Paramètre de la source	Condition
Sheath Gaz Temp (°C)	400
Sheath Gaz Flow (L/min)	12
Nebulizer Pressure (psi)	55
Nozzle Voltage (V)	250
Capillary Voltage (V)	2500
Drying Gaz Temp (°C)	300
Drying Gaz Flow (L/min)	12

L'analyse est effectuée par détection de transitions multiples (MRM: Multiple Reaction Monitoring), en mode positif et permet d'analyser plusieurs transitions simultanément (ion parent > ion fragment). Les ions parents et ions fils sont indiqués en masse/charge (m/z) (**Tableau 11**).

Les composés analysés ont un temps de rétention stable et reproductible (**Tableau 12**), autour de 10 min pour les acyl-carnitines et entre 14-17,5 min pour les molécules polaires telles que l'acétyl-carnitine, la carnitine ou la γ-butyrobétaine. Ainsi, des segments de temps sont ajoutés à l'analyse pour cibler la recherche des composés d'intérêt, améliorer la sensibilité de détection et limiter une pollution inutile du spectromètre de masse.

Tableau 11: Ions parents et ions fils des différentes molécules analysées.

Composé	Formule	Masse (g/mol)	Precurso r (m/z)	Ion fils (m/z)	Tension de Fragmente ur (V)	Dwell time (ms)	Energie de Collision (eV)
γ-butyrobétaïne	$C_7H_{15}NO_2$	146,1	147,1	87,1	90	100	12
				60,2	90	100	12
Glycine bétaïne	$C_5H_{11}NO_2$	117.1	118.1	59.1	115	200	16
				58.1	115	200	28
Carnitine	$C_7H_{15}NO_3$	161,1	162,1	60,1	120	100	16
				103,1	120	100	12
D3-Carnitine	$D_3C_4H_{15}NO_3$	164,1	165,1	63,2	120	100	16
				103,1	120	100	12
Acétyl-carnitine	$C_9H_{17}NO_4$	203,1	204,1	85,0	95	100	16
				60,1	95	100	12
Lauroyl-carnitine	$C_{19}H_{37}NO_4$	343,3	344,3	85,0	160	80	24
				60,1	160	80	20
Myristoyl-carnitine	$C_{21}H_{41}NO_4$	371,3	372,3	85,0	160	80	24
				60,1	160	80	20
[^{13}C]palmitoyl-carnitine	$C_{23}H_{45}NO_4D_2$	403,4	404,4	85,0	170	80	28
				60,1	170	80	24
Palmitoyl-carnitine	$C_{23}H_{45}NO_4$	399,3	400,3	85,0	165	80	28
				60,1	165	80	24
Stéaroyl-carnitine	$C_{25}H_{49}NO_4$	427,4	428,4	85,0	165	80	24
				60,1	165	80	24
Oléoyl-carnitine	$C_{25}H_{47}NO_4$	425,4	426,4	85,0	185	80	28
				60,1	185	80	24
Linoléoyl-carnitine	$C_{25}H_{45}NO_4$	423,3	424,3	85,0	155	80	28
				60,1	155	80	24
Arachidoyl-carnitine	$C_{27}H_{53}NO_4$	455,4	456,4	85,0	190	80	28
				60,1	190	80	24

Tableau 12: Temps de rétention des composés analysés.

Segment de temps	Temps (min)	Position de la valve
1	0	Waste
2	9	MS
3	12	MS
4	20	Waste

Les chromatogrammes sont traités avec le logiciel Quantitative Analysis (Agilent). La quantification des composés recherchés est réalisée par étalonnage interne, selon la formule suivante:

$$Q_A = A_A/A_{EI} \times Q_{EI}$$

Q_A : teneur du composé à déterminer
A_A : aire de pic du composé
A_{EI} : aire de pic de l'étalon interne
Q_{EI} : quantité connue d'étalon interne ajouté lors de l'extraction, 5 $ng.mg^{-1}$ MS pour la carnitine deuterée et 5 $pg.mg^{-1}$ MS pour le [^{13}C]palmitoyl-carnitine

La carnitine libre est quantifiée par rapport à la carnitine deutérée et les différentes acyl-carnitines par rapport au [^{13}C]palmitoyl-carnitine. Par contre, en l'absence de standard marqué pour la γ-butyrobétaïne et la glycine bétaïne, celles-ci sont quantifiées par la méthode des ajouts dosés (Bourdin *et al.*, 2007) où l'échantillon est tout d'abord dosé sans ajout de standard (aire de pic A) puis avec ajout, au moment de l'analyse, d'un standard commercial de concentration connue (aire de pic As, concentration Cs). Le calcul de concentration de l'analyte dans l'extrait est effectué selon la formule :

$$C = A \times Cs/(As - A)$$

Les teneurs sont toutes exprimées par rapport à la matière sèche (MS) de l'échantillon végétal mesurée à 11% dans nos plantules d'Arabidopsis.

Chapitre III – RECHERCHE D'ENZYMES CANDIDATES POTENTIELLEMENT IMPLIQUEES DANS LA SYNTHESE DE LA CARNITINE CHEZ *A. THALIANA*

La voie de biosynthèse de la carnitine chez Arabidopsis présente des similitudes avec les voies de synthèse bien caractérisées des mammifères et de la levure *C. albicans*. En effet, les précurseurs trimethyllysine (TML) et γ-butyrobétaïne (γ-BB) sont présents au côté de la carnitine dans des extraits de plantules d'Arabidopsis, et une supplémentation du milieu de culture avec de la TML deutérée montre la relation métabolique qui existe entre ces trois molécules (Rippa *et al*., 2012). Des activités enzymatiques similaires pourraient donc être impliquées dans la synthèse de la carnitine chez les plantes, les mammifères et les levures. Ceci nous a amené à rechercher, dans les banques de séquences d'Arabidopsis, des enzymes candidates homologues aux enzymes en charge de la synthèse de la carnitine chez ces organismes.

L'étude de mutants perte de fonction de ces enzymes sera très informative pour avancer dans la connaissance de la voie de biosynthèse de la carnitine et déterminer son mode d'implication dans la physiologie de la plante par une approche de génétique inverse. C'est pourquoi une recherche de mutants perte de fonction des enzymes candidates, déjà caractérisés ou non, a également été initiée.

1. Recherche bioinformatique

Les séquences peptididiques des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine animale ou de levure ont été utilisées pour une recherche d'homologie afin d'identifier des protéines candidates dans la banque de données d'Arabidopsis (http://www.arabidopsis.org/; BLASTP). Seuls les résultats obtenus pour la deuxième et troisième étape de la synthèse de carnitine (**Figure 8**) sont ici décrits puisqu'aucune homologie significative n'est trouvée chez Arabidopsis pour les étapes 1 et 4 (Cf paragraphe 2.1, chapitre I).

1.1 Recherche de candidats HTMLA (3-hydroxy-6-*N*-triméthyllysine aldolase) chez Arabidopsis

L'enzyme HTMLA chez les animaux et la levure *C. albicans* prend en charge la conversion de l'HTML en TMABA dans la voie de biosynthèse de la carnitine. La séquence de la protéine cytosolique humaine SHMT (AAH38598.1), probable HTMLA (Vaz *et al*., 2010), de l'HTMLA (EAK91851.1) et de la protéine GLY1 (AAB64198.1) de *C. albicans* (Strijbis *et al*., 2009) ont été utilisées pour chercher des homologues chez *A. thaliana.* Les résultats obtenus

sont présentés dans les **tableaux 13** à **15**.

Tableau 13: Protéines d'Arabidopsis homologues à la protéine SHMT humaine (AAH38598.1).

Locus	N.A	Protéine	Identité	Similarité
AT4G37930	AEE86855.1	SHMT1	58%	74%
AT5G26780	AED93602.1	SHMT2	57%	73%
AT4G32520	AEE86071.1	SHMT3	59%	74%
AT4G13930	AEE83344.1	SHMT4	58%	70%
AT4G13890	AEE83342.1	SHMT5	55%	69%
AT1G22020	AEE30186.1	SHMT6	49%	65%
AT1G36370	AEE31862.1	SHMT7	48%	64%

* N.A : Numéro d'accession

Tableau 14: Protéines d'Arabidopsis homologues à la protéine HTMLA de *C. albicans* (EAK91851.1).

Locus	N.A	Protéine	Identité	Similarité
AT1G08630	AEE28323.1	THA1	35%	55%
AT3G04520	AEE74092.1	THA2	37%	56%

* N.A : Numéro d'accession

Tableau 15: Protéines d'Arabidopsis homologues à la protéine GLY1 de *C. albicans* (AAB64198.1).

Locus	N.A	Protéine	Identité	Similarité
AT1G08630	AEE28323.1	THA1	34%	50%
AT3G04520	AEE74092.1	THA2	34%	52%

* N.A : Numéro d'accession

Sept protéines SHMT (sérine hydroxyméthyl transférases) homologues à la SHMT humaine sont codées par le génome d'Arabidopsis. Parmi celles-ci, SHMT1, SHMT2 et SHMT3 sont les plus proches en terme de séquence (plus de 57 % d'identité et plus de 73 % de similarité). Deux protéines THA (thréonine aldolases) identiques à plus de 34 % avec les protéines HTMLA ou GLY1 de *C. Albicans* sont identifiées chez Arabidopsis.

1.2 Recherche de candidats TMABADH (4-*N*-trimethylaminobutyraldeyde déshydrogénase) chez Arabidopsis

De la même manière, la séquence de la TMABADH humaine, qui correspond à la protéine ALDH9 (AAB18827.1), et celle de la TMABADH de *C. albicans* (EAK91852.1) ont été utilisées pour rechercher des candidats homologues chez Arabidopsis. Les résultats obtenus sont présentés dans les **tableaux 16** et **17**.

Tableau 16: Protéines d'Arabidopsis homologues à la protéine ALDH9 humaine (AAB18827.1).

Famille	Locus	N.A	Nom	Identité	Similarité
2	**AT3G48000**	**AEE78355.1**	**ALDH2B4**	**39%**	**57%**
2	**AT1G23800**	**AEE30433.1**	**ALDH2B7**	**38%**	**56%**
2	**AT3G24503**	**AEE76907.1**	**ALDH2C4**	**36%**	**57%**
3	AT4G36250	AEE86639.1	ALDH3F1	27%	46%
3	AT1G44170	AEE32026.1	ALDH3H1	31%	50%
3	AT4G34240	AEE86347.1	ALDH3I1	30%	48%
5	AT1G79440	AEE36243.1	ALDH5F1	38%	53%
6	AT2G14170	AEC06287.1	ALDH6B2	29%	48%
7	AT1G54100	AEE33049.1	ALDH7B4	26%	45%
10	**AT1G74920**	**AEE35649.1**	**ALDH10A8**	**38%**	**57%**
10	**AT3G48170**	**AEE78376.1**	**ALDH10A9**	**39%**	**56%**
11	AT2G24270	AEC07554.1	ALDH11A3	28%	45%
12	AT5G62530	AED97619.1	ALDH12A1	20%	35%
22	AT3G66658	AEE74433.1	ALDH22A1	30%	45%

* N.A : Numéro d'accession

Tableau 17: Protéines d'Arabidopsis homologues à la protéine TMABADH de *C. albicans* (EAK91852.1).

Famille	Locus	N.A	Nom	Identité	Similarité
2	**AT3G48000**	**AEE78355.1**	**ALDH2B4**	**47%**	**63%**
2	**AT1G23800**	**AEE30433.1**	**ALDH2B7**	**48%**	**62%**
2	**AT3G24503**	**AEE76907.1**	**ALDH2C4**	**46%**	**62%**
3	AT4G36250	AEE86639.1	ALDH3F1	30%	47%
3	AT1G44170	AEE32026.1	ALDH3H1	29%	46%
3	AT4G34240	AEE86347.1	ALDH3I1	28%	42%
5	AT1G79440	AEE36243.1	ALDH5F1	36%	54%
6	AT2G14170	AEC06287.1	ALDH6B2	32%	48%
7	AT1G54100	AEE33049.1	ALDH7B4	28%	48%
10	**AT1G74920**	**AEE35649.1**	**ALDH10A8**	**42%**	**60%**
10	**AT3G48170**	**AEE78376.1**	**ALDH10A9**	**42%**	**58%**
11	AT2G24270	AEC07554.1	ALDH11A3	31%	49%
12	AT5G62530	AED97619.1	ALDH12A1	21%	41%
22	AT3G66658	AEE74433.1	ALDH22A1	30%	48%

* N.A : Numéro d'accession

Le génome d'Arabidopsis code pour 14 enzymes ALDH (aldéhyde déshydrogénases) appartenant à 9 familles différentes. Parmi celles-ci, les protéines des familles 2 et 10 sont les plus proches des protéines humaine et de levure en terme de séquence. L'homologie des protéines de la famille 2 et 10 est équivalente lorsque l'on compare les protéines d'Arabidopsis et la protéine humaine (36 à 39 % d'identité et 56 à 57 % de similarité) alors que les protéines de la famille 2 sont plus proches de la protéine de levure que celles de la famille 10 (46 à 48 % d'identité contre 42 %). D'après ces valeurs, il apparait également que l'homologie entre les meilleurs candidats de plantes est plus importante lorsque l'on compare leur séquence avec celle de la protéine de levure.

2. Données bibliographiques sur les protéines d'Arabidopsis homologues aux protéines humaines et de levure impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine

Sur la base de leurs séquences peptidiques, plusieurs protéines candidates seraient susceptibles de participer à la synthèse de la carnitine chez Arabidopsis. Avant d'envisager leur implication, nous avons étudié les données bibliographiques disponibles sur ces enzymes afin de déterminer si leur fonction est déjà caractérisée.

2.1 Protéines homologues aux HTMLA chez Arabidopsis

Les protéines candidates pour prendre en charge la conversion de l'HTML en TMABA chez Arabidopsis sont des enzymes SHMT et THA.

2.1.1 Protéines SHMT

Les enzymes SHMT (parfois nommées SHM par certains auteurs) sont des enzymes importantes du métabolisme cellulaire à 1 carbone impliquées dans une multitude de voies de biosynthèse et dans la conversion de glycine en serine par la photorespiration dans les mitochondries du mésophylle foliaire (Voll *et al*., 2006). La localisation subcellulaire des protéines SHMT d'Arabidopsis est démontrée comme étant mitochondriale (protéines SHMT1 et 2), chloroplastique (SHMT3), et proposée comme étant cytosolique (SHMT4 et 5) ou nucléaire (SHMT6 et 7) (Engel *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010; Jamai *et al.*, 2009). L'enzyme mitochondriale SHMT1 est impliquée dans la photorespiration. Le mutant *shm1-1* n'est pas viable lorsqu'il est cultivé à concentration ambiante en CO_2, mais ne présente pas ce phénotype à forte concentration en CO_2 (Voll *et al*., 2006). L'étude d'un mutant faible nommé *shmt1-1* a montré que SHMT1 jouerait un rôle essentiel dans le contrôle des dommages cellulaires provoqués par les stress abiotiques et biotiques. Ce mutant a un retard de développement et une taille plus petite que les plantes sauvages (Moreno *et al*., 2005). Il a également été renommé *shm1-3* (Voll *et al.*, 2006). La séquence de l'enzyme SHMT2 est identique à 85 % et similaire à 92 % à celle de la protéine SHMT1, mais les deux protéines ne sont pas redondantes. En effet une surexpression de SHMT2 ne complémente pas la déficience en SHMT1 chez le mutant *shm1-1* et l'expression du gène *SHMT2* est faible dans les tissus photosynthétiques et plus importante dans les racines alors que l'expression de *SHMT1* est retrouvée dans tous les tissus végétatifs (Voll *et al*., 2006). D'autre part, des mutants perte de fonction de SHMT2 existent (*shm2-1* et *shm2-2*) et sont viables à teneur ambiante en CO_2 (Voll *et al*., 2006; Engel *et al.*, 2011).

2.1.2 Protéines THA

Les thréonine aldolases (THA) d'Arabidopsis, sont impliquées dans le métabolisme des acides aminés. En effet, le mutant faible *tha1-1* et le mutant perte de fonction *tha1-2*, ont notamment une concentration augmentée en thréonine et diminuée en glycine par rapport aux plantes sauvages (Jander *et al*., 2004; Joshi *et al.*, 2006). A la différence de THA1, la protéine THA2 est essentielle pour la plante. En effet, une mutation perte de fonction de cette protéine abolit la viabilité à l'état homozygote, les graines présentant un phénotype albinos et les

plantules ne se développant pas au-delà du stade dicotylédonaire (Joshi *et al*., 2006). Le gène *THA1* est exprimé principalement dans les graines et les plantules, alors que *THA2* est exprimé dans le tissu vasculaire de toute la plante (Joshi *et al*., 2006). Ces protéines pourraient intervenir dans le maintien de l'homéostasie de la glycine.

2.2 Protéines homologues aux TMABADH chez Arabidopsis

Les aldéhyde déshydrogénases (ALDH) sont des enzymes dépendantes du cofacteur NAD^+ (nicotinamide adénine dinucléotide) ou $NADP^+$ (NAD phosphate) et impliquées dans la conversion d'aldéhydes variés en l'acide carboxylique correspondant. Elles interviennent chez les plantes dans de nombreuses voies métaboliques et dans l'élimination d'aldéhydes réactifs potentiellement toxiques générés par la peroxydation des lipides. Chez *A. thaliana* elles constituent une superfamille d'enzymes impliquées notamment dans les mécanismes de défense aux stress abiotiques dont certains dépendent de l'ABA (acide abscissique) (Kirch *et al*., 2004; Kirch *et al*., 2005; Stiti *et al.*, 2011). Ces enzymes ont une gamme de substrats plus ou moins étendue et sont trouvés dans différents compartiments subcellulaires (cytosol, mitochondrie, plaste, microsome).

2.2.1 Protéines ALDH2

Chez Arabidopsis, la famille des protéines ALDH2 contient 3 membres. La protéine ALDH2C4, localisée dans le cytosol, est impliquée dans la production d'acide férulique et sinapique pour la biosynthèse de lignine (Nair *et al.*, 2004). Les autres protéines, ALDH2B7 et ALDH2B4 sont mitochondriales. Elles interviendraient dans le « PDH bypass » ou contournement de la pyruvate déshydrogénase décrit chez la levure et qui consiste en l'oxydation d'acétaldéhyde produit par fermentation éthanolique fournissant de l'acétate pour la biosynthèse d'acétyl-CoA (Wei *et al*., 2009). En effet, des plantes d'Arabidopsis homozygotes pour des mutations perte de fonction des gènes *ALDH2B4* et *ALDH2B7* présentent un taux d'incorporation du ^{14}C-éthanol dans les AG plus faible que des plantes sauvages lorsque ce substrat est ajouté au milieu de culture. La protéine ALDH2B4 semble être la plus impliquée dans ce processus. Ces données ont permis de confirmer l'existence de cette voie métabolique alternative dans les tissus sporophytiques des plantes.

2.2.2 Protéines ALDH10

La famille des protéines ALDH10 de plantes regroupe des protéines également appelées AMADH (amino aldéhyde déshydrogenases) qui oxydent des ω-aminoaldéhydes en leurs acides correspondants (Kopecny *et al.*, 2013). Ces enzymes sont notamment liées au catabolisme des polyamines et à l'osmoprotection (Brocker *et al*., 2013). Elles ont fait l'objet de plusieurs études pour leur intérêt économique. En effet, certaines mutations de protéines ALDH10 ont conduit à la production de molécules odorantes par certaines plantes comme le riz ou de soja (Bradbury *et al.*, 2008; Arikit *et al.*, 2011). La plupart des espèces végétales comptent deux membres dans cette famille (Brocker *et al.*, 2013). Ainsi chez Arabidopsis elle est constituée des protéines ALDH10A8 et ALDH10A9 également nommées BADH (bétaïne aldéhyde déshydrogénases), initialement proposées comme responsables de la dernière étape de catalyse dans la synthèse de l'osmoprotectant qu'est la glycine bétaïne chez les plantes. Les protéines ALDH10A8 et ALDH10A9 sont localisées respectivement dans le leucoplaste et le péroxysome (Missihoun *et al.*, 2011). Les gènes correspondants sont faiblement inductibles par les stress abiotiques et un mutant perte de fonction de ALDH10A8 nommé *KO8-2* est plus sensible au stress salin et à la déshydratation. Arabidopsis n'étant pas une plante accumulant la glycine bétaïne en conditions de stress salin, les protéines ALDH10 sont proposées comme étant impliquées dans le contrôle du niveau d'aminoaldéhydes produits par le métabolisme cellulaire en conditions de stress (Missihoun *et al.*, 2011).

Les ALDH10 de plantes sont capables de prendre en charge une large gamme d'aminoaldéhydes avec des spécificités de substrat différentes (Kopecny *et al.*, 2013) (**Figure 19**). En effet chez Arabidopsis, la protéine ALDH10A9 peut oxyder la betaïne aldéhyde, la 4-aminobutyraldéhyde (ABAL) et la 3-aminopropionaldéhyde (APAL) *in vitro* (Missihoun *et al.*, 2011). De même, chez *Pisum sativum* PsAMADH1 et PsAMADH2 sont capables d'oxyder ces mêmes substrats ainsi que le 4-guanidinobutyraldéhyde (GBAL) et le TMABAL (TMABA) *in vitro* (Tylichova *et al*., 2010).

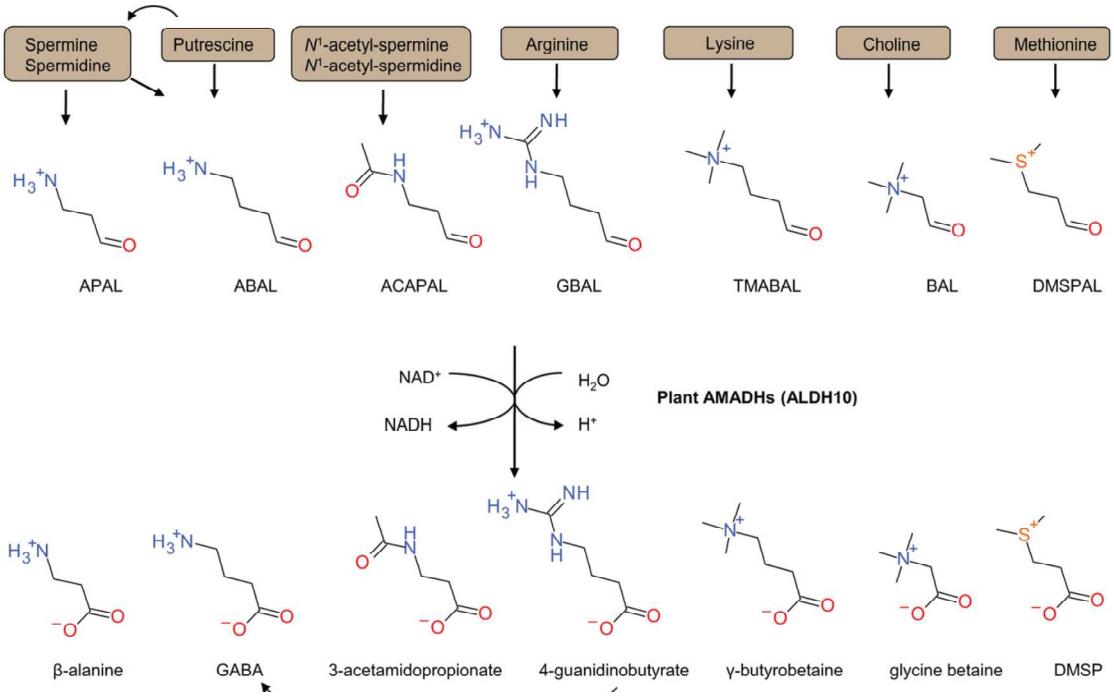


Figure 19: Substrats naturels potentiellement oxydés par les membres de la famille des ALDH10 de plantes (ou AMADH) (Kopecny *et al*., 2013). APAL: 3-aminopropionalaldéhyde, ABAL: 4-aminobutyraldéhyde, ACAPAL: 3-acétamidopropionaldéhyde, GBAL: 4-guanidinobutyraldéhyde, TMALBL: *N*,*N*,*N*-triméthyl-4-aminobutyraldéhyde, BAL: bétaïne aldéhyde, DMSPAL: diméthylsulfoniopropionaldéhyde，GABA: γ-aminobutyric acide, DMSP: 3-diméthylsulfoniopropionate.

3. Mutants avérés ou probables des protéines d'Arabidopsis homologues aux protéines humaines et de levure impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine

D'après les données de la littérature, certaines des protéines présentant de bonnes homologies avec les enzymes impliquées dans la synthèse de carnitine chez l'animal ou la levure ont fait l'objet d'études approfondies, notamment pas le biais de l'étude de mutants (**Tableau 18**). Ces génotypes peuvent être étudiés d'un point de vue de leur teneur en carnitine, afin d'envisager une éventuelle implication des enzymes correspondantes dans la voie de biosynthèse de cet acide aminé.

Tableau 18: Mutants de protéines d'Arabidopsis homologues à une protéine impliquée dans la synthèse de carnitine animale ou de levure.

Enzyme homologue	Protéine d'Arabidopsis	Mutant	ID NASC	Publications associées
HTMLA	SHMT1	*shm1-1*	_	Voll *et al.*, 2006
		shm1-2	SALK_083735	Voll *et al.*, 2006
		shmt1-1 ou shm1-3	_	Moreno *et al*., 2005
		shmt1-2	SALK _083735	Moreno *et al*., 2005
	SHMT2	*shm2-1*	SALK _095881	Voll *et al.*, 2006
		shm2-2	SALK_096265	Engel *et al.*, 2011
	THA1	*tha1-1*	_	Joshi *et al*., 2006
		tha1-2	GK-767E02	Joshi *et al*., 2006
		tha1-3	SALK_134724c	Ajjawi *et al*., 2010
	THA2	*THA2/tha2-1*	SAIL_5_C01	Joshi *et al*., 2006
		THA2/tha2-2	SALK _129163	Joshi *et al*., 2006
TMABADH	ALDH2B4	*aldh2B4-1*	CSJ2971	Wei *et al*., 2009
		aldh2B4-2	SALK _078568	Wei *et al*., 2009
	ALDH2B7	*aldh2B7-1*	CSJ989	Wei *et al*., 2009
	ALDH2C4	*aldh2C4-1*	SALK_027911	Wei *et al*., 2009
		aldh2C4-2	SALK_024974	Wei *et al*., 2009
	ALDH10A8	*KO8-2*	SK24056	Missihoun *et al.*, 2011

Lorsque pour certaines protéines candidates des mutants ne sont pas décrits dans la littérature une recherche de lignée présentant une insertion d'ADN-T dans le gène d'intérêt a été réalisée dans les collections disponibles auprès du Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) (**Tableau 19**). Cette recherche s'est limitée à la protéine SHMT3 pour les candidats homologues SHMT sur le critère de sa plus grande homologie avec les HTMLA que les autres protéines SHMT d'Arabidopsis.

Tableau 19: Lignées d'Arabidopsis portant une insertion d'ADN-T dans un gène homologue à un gène impliqué dans la synthèse de carnitine animale ou de levure (les noms de lignées font référence à la position de l'insertion dans la séquence du gène et seront explicités dans les chapitres IV et V).

Enzyme homologue	Protéine d'Arabidopsis	Lignée	ID NASC
HTMLA	SHMT3	*shmt3e*$_{11}$	SALK _113687
		shmt3p	SALK _022634
TMABADH	ALDH10A9	*10A9e*$_{1}$	SAIL _543_H01
		10A9$_{3'}$	SALK _148085

4. Conclusion

Une recherche bioinformatique chez Arabidopsis a permis de mettre en évidence des protéines présentant une homologie significative avec des protéines connues pour être impliquées dans la synthèse de la carnitine chez l'homme ou la levure *C. albicans* (Rippa *et al.*, 2012). Des enzymes des familles SHMT, THA et ALDH peuvent être envisagées comme participant au métabolisme de la carnitine chez la plante, bien que d'autres fonctions aient été proposées pour certaines d'entre-elles. Des lignées mutantes étant disponibles, un dosage de la carnitine et de ses précurseurs renseignera sur une éventuelle implication des enzymes correspondantes dans la voie de biosynthèse de la carnitine. Pour d'autres protéines, la fonction n'a pas été caractérisée et une recherche de mutant perte de fonction permettra d'étudier un lien éventuel entre l'enzyme et la carnitine.

Chapitre IV – ETUDE DE L'IMPLICATION DES ENZYMES D'ARABIDOPSIS HOMOLOGUES AUX HTMLA DANS LA SYNTHESE DE CARNITINE

Des enzymes de la famille des SHMT (sérine hydroxyméthyltransférases) et THA (thréonine aldolases) chez *A. thaliana* présentent des homologies de séquence significatives avec l'enzyme HTMLA humaine (identité de plus de 57 %) et de la levure *C. albicans* (identité de plus de 34 %) impliquées dans la synthèse de la carnitine chez ces organismes. La participation éventuelle des ces protéines à la voie de biosynthèse de l'acide aminé carnitine chez Arabidopsis a donc été étudiée en analysant et/ou recherchant des mutants de ces enzymes.

Des lignées mutantes avérées ou portant une insertion d'ADN-T dans les gènes codant pour ces protéines sont disponibles (**Tableaux 18** et **19**, chapitre III). Les lignées d'insertion, lorsqu'elles sont fournies par la banque NASC, sont à l'état hétérozygote. Afin de pouvoir étudier l'impact d'une insertion d'ADN-T dans un gène d'intérêt il est donc indispensable au préalable de rechercher des plantes homozygotes pour cette insertion puis d'étudier l'effet de la mutation sur la transcription du gène. Les lignées candidates (mutants avérés et lignées d'insertion après obtention d'homozygotes) ont donc été étudiées d'un point de vue de leur teneur en carnitine et de son précurseur chez l'animal et la levure, la γ-butyrobétaïne. Le stade de développement choisi pour ces analyses a été le stade 72 h de développement post-imbibition. En effet, au cours du développement des plantules d'Arabidopsis, la teneur en carnitine augmente jusqu'à atteindre une valeur seuil à 48-72 h pour diminuer ensuite (Charrier *et al.*, 2012).

1. Protéines SHMT

Des mutants pertes de fonction ou mutants faibles des protéines SMH1 et 2 ont été caractérisés (Moreno *et al.*, 2005; Voll *et al.*, 2006; Engel *et al.*, 2011). Concernant la protéine SHMT1 le choix de la lignée mutante étudiée a porté sur le mutant *shmt1-1* car c'est un mutant faible et viable à teneur ambiante en CO_2 (Moreno *et al.*, 2005). Concernant la protéine SHMT2, une étude du mutant perte de fonction *shm2-1* est possible (Voll *et al.*, 2006). Au contraire, pour la protéine SHMT3, il a été nécessaire d'étudier au préalable les lignées SALK_113687 et SALK_022634 afin de déterminer si l'expression du transcrit *SHMT3* est affectée par l'insertion d'ADN-T qu'elles contiennent avant de rechercher un lien éventuel entre la protéine et la synthèse de carnitine.

1.1 Etude du mutant *shmt1-1*

Le mutant *shmt1-1* porte une mutation ponctuelle dans l'exon 13 de la séquence codante du gène ce qui occasionne un changement d'un acide aminé proline en sérine (Moreno *et al*., 2005) (**Figure 20**).

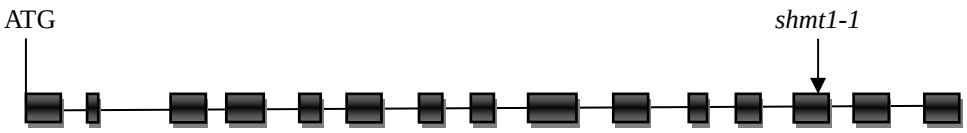


Figure 20: Structure du gène *SHMT1* et position de la mutation chez *shmt1-1* (les rectangles symbolisent les exons, les lignes symbolisent les introns). Taille du gène : 3197 pb.

Afin d'étudier le lien éventuel entre l'enzyme SHMT1 et la synthèse de la carnitine chez *A. thaliana* une analyse par LC-ESI-MS/MS de la teneur en γ-butyrobétaïne (γ-BB) et en carnitine libre a été initiée sur des extraits de plantules *shmt1-1* et Col-0 cultivée *in vitro* sur du milieu M&S.

1.1.1 Analyse de la teneur en γ-BB

La teneur moyenne en γ-BB dans des extraits de plantules *shmt1-1* de 72 h est de 2,187 ± 0,378 ng.mg^{-1} MS contre 3,117 ± 0,589 ng.mg^{-1} MS dans des extraits de plantules Col-0, soit une réduction de 29,8 % de la teneur en γ-BB chez le mutant (**Figure 21**). Il faut souligner que d'une manière générale une variabilité non négligeable est observée pour les dosages de précurseurs entre les expérimentations pourtant faites en conditions contrôlées et avec les mêmes génotypes.

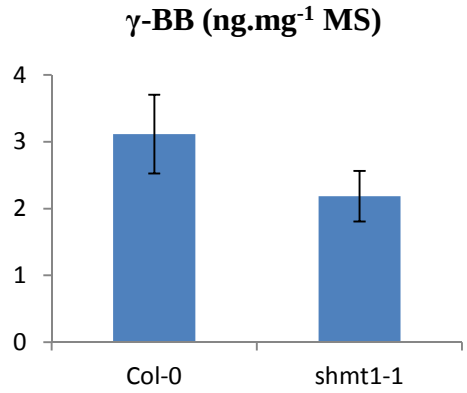


Figure 21: Teneur en γ-BB dans des extraits de plantules d'*A. thaliana* Col-0 et *shmt1-1* de 72 h cultivées sur milieu M&S (MS: matière sèche). Les résultats représentent la moyenne de trois

répétitions biologiques indépendantes (± l'écart-type).

1.1.2 Analyse de la teneur en carnitine

Ces mêmes extraits végétaux ont été analysés d'un point de vue de la teneur en carnitine libre. Celle de plantules *shmt1-1* est réduite d'environ 29,3 % par rapport à celle de plantules sauvages (**Figure 22**). En effet les plantules du mutant contiennent en moyenne 0,281 ± 0,097 ng.mg^{-1} MS de carnitine libre contre 0,398 ± 0,086 ng.mg^{-1} MS pour les plantules Col-0.

Dans la mesure où une fraction de la carnitine chez Arabidopsis est présente sous forme d'acyl-carnitines (Bourdin *et al*., 2007), une saponification a été faite sur des extraits végétaux afin de libérer cette fraction de carnitine liée pour quantifier la carnitine totale. Des extraits de plantules *shmt1-1* cultivées *in vitro* pendant 72 h sur du milieu M&S contiennent 1,4 fois moins de carnitine totale en moyenne que les extraits obtenus à partir de plantes sauvages (0,393 ± 0,034 ng.mg^{-1} MS contre 0,547 ± 0,107 ng.mg^{-1} MS), soit une diminution de 28,1 %. De la même manière la carnitine estérifiée est diminuée de 24,3 % chez le mutant (0,112 ± 0,093 ng.mg^{-1} MS contre 0,148 ± 0,048 ng.mg^{-1} MS) (**Figure 22**).

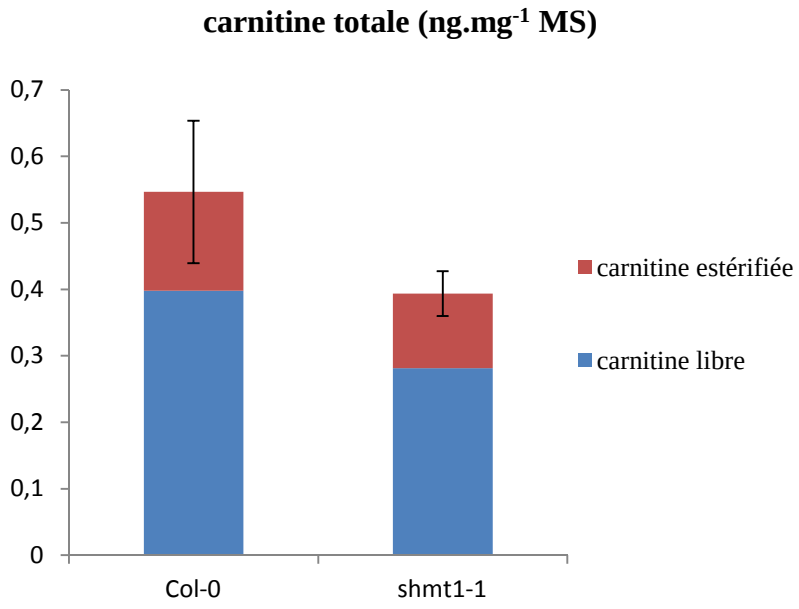


Figure 22: Teneur en carnitine libre et estérifiée dans des extraits de plantules d'*A. thaliana Col-0* et *shmt1-1* de 72 h cultivées sur milieu M&S (MS: matière sèche). Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions biologiques indépendantes (± l'écart-type concernant les valeurs de carnitine totale).

1.1.3 Analyse de la teneur en acyl-carnitines

Une quantification de la teneur en différentes acyl-carnitines de longueur de chaine carbonée variable a également été réalisée sur des extraits végétaux obtenus à partir de plantules de 72 h Col-0 et *shmt1-1*.

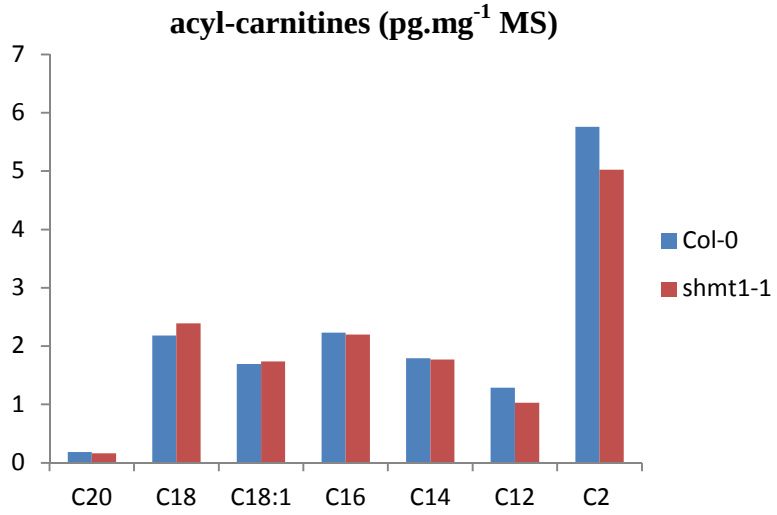


Figure 23: Teneurs en acyl-carnitines des plantules d'*A. thaliana* Col-0 et *shmt1-1* de 72 h cultivées sur milieu M&S (MS: Matière Sèche) (C20: arachidoyl-canitine, C18: stéaroyl-carnitine, C18:1: oléoyl-carnitine, C16: palmitoyl-carnitine, C14: myristoyl-carnitine, C12: lauroyl-carnitine, C2: acétyl-carnitine).

Les teneurs en différentes acyl-carnitines d'extraits de plantules *shmt1-1* et Col-0 ne semblent pas présenter de différence (**Figure 23**). D'autre part, la quantité totale d'acyl-carnitines analysées est de 14,3 pg.mg^{-1} MS pour le génotype *shmt1-1* et 15,1 pg.mg^{-1} MS pour le génotype sauvage dans cette expérience. Une répétition biologique indépendante a donné des résultats comparables (13,5 pg.mg^{-1} MS d'acyl-carnitines dans les extraits de *shmt1-1* contre 12,8 pg.mg^{-1} MS dans les extraits de Col-0). Aucune différence de la teneur totale en acyl-carnitines n'a donc été constatée entre les deux génotypes. Il faut noter ici que cette teneur en différentes acyl-carnitines ne représente qu'environ 8,6 à 12,7 % de la fraction de carnitine libérée par saponification (**Figure 22**). Une fraction importante de carnitine estérifiée n'est donc pas identifiée au cours de ces analyses.

1.1.4 Etude du développement précoce du mutant *shmt1-1*

Des plantules *shmt1-1* de 15 jours sont nettement moins développées que des plantules sauvages (Moreno *et al.*, 2005). Il n'y a pas de donnée dans la littérature sur d'éventuelles

différences phénotypiques visibles aux stades précoces de développement des plantules. Aussi il a été nécessaire d'étudier la germination et le développement de plantules de *shmt1-1* afin de voir si les différences observées au niveau des teneurs en carnitine peuvent être liées à des phénotypes observables à ces stades.

Un suivi de la germination et du développement post-germinatif du mutant *shmt1-1* a été réalisé. Des graines des deux génotypes semées sur milieu M&S ont été comptées et observées pendant 4 jours. Il a été constaté que 93 % des graines *shmt1-1* et 92 % des graines Col-0 germent après 24 h de culture. Ceci montre que le pouvoir germinatif des graines n'est pas affecté par la mutation chez *shmt1-1*. Par contre après 72 h, 82,4 % des plantules du mutant et 92,8 % des plantules Col-0, présentent des cotylédons ouverts. Ces données sont significatives au regard d'un test X^2 ($P < 0,001$). D'autre part, bien qu'au même stade de développement, les plantules *shmt1-1* et Col-0 ont des caractéristiques visibles différentes. En effet à partir de 48 h les plantules *shmt1-1* apparaissent plus petites que les plantules Col-0 (**Figure 24**).

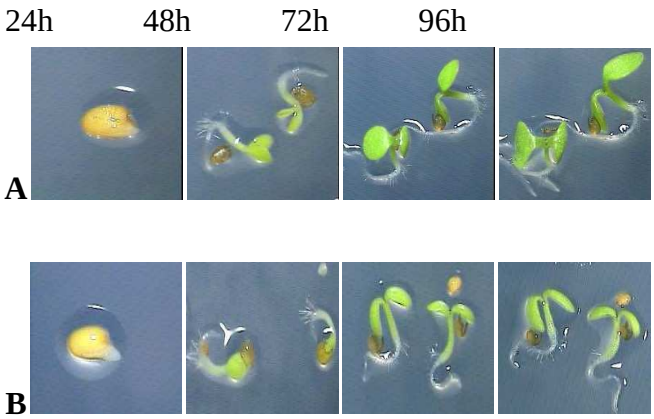


Figure 24: Suivi de la germination et du développement post-germinatif des plantules sauvages d'*A. thaliana* Col-0 (**A**) et du mutant *shmt1-1* (**B**) sur milieu M&S.

Un retard de développement des plantes *shmt1-1* cultivées 15 jours en serre est bien notable par rapport aux plantes Col-0. Les plantes *shmt1-1* ont une taille plus petite, les feuilles sont plus nombreuses, moins développées et chlorotiques, par rapport aux feuilles des plantes Col-0 (**Figure 25**).



Figure 25: Plantes Col-0 et *shmt1-1* cultivées en serre après 15 jours.

1.2 Recherche d'un mutant perte de fonction de *SHMT2*

Concernant l'enzyme SHMT2, un mutant perte de fonction *shm2-1* est décrit dans la littérature (Voll *et al.*, 2006). Ces graines n'ayant pas pu être obtenues à l'état homozygote auprès des auteurs, une recherche d'individus homozygotes pour l'insertion d'ADN-T située dans l'exon 14 de la séquence du gène (**Figure 26**) a été réalisée par génotypage PCR sur l'ADN extrait de plantules de la lignée SALK _095881 à l'aide des amorces SR132, SR133 dont le site d'hybridation est situés de part et d'autre de l'insertion, et de l'amorce LB1a dont le site d'hybridation est situé dans la bordure gauche de l'ADN-T. Malheureusement l'insertion telle que décrite n'a pas été mise en évidence et il semble que les graines obtenues auprès de la banque NASC étaient en fait de génotype sauvage.

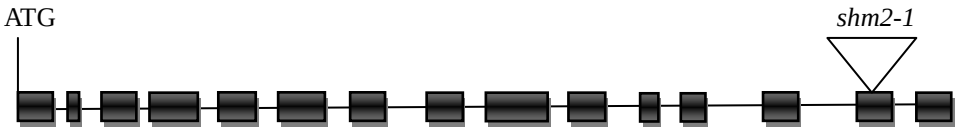


Figure 26: Structure du gène *SHMT2* et position de l'insertion dans la lignée *shm2-1* (les rectangles symbolisent les exons, les lignes symbolisent les introns). Taille du gène : 3897 pb.

Le mutant perte de fonction *shm2-2* est également décrit (Engel et *al.*, 2011). Cependant les graines se sont avérées indisponibles au moment de l'analyse. Aussi il n'a pas été possible d'étudier un mutant perte de fonction de la protéine SHMT2 dans le cadre de ces travaux.

1.3 Recherche d'un mutant perte de fonction de *SHMT3*

Concernant la protéine SHMT3, deux lignées contenant une insertion d'ADN-T sont disponibles. L'une d'elle contient un ADN-T dans le promoteur du gène *SHMT3*, il s'agit de la lignée SALK _022634, ici renommée *shmt3p*. Une autre lignée contient une insertion au début du dernier exon, il s'agit de la lignée SALK_113687, renommée *shmt3e$_{11}$* (**Figure 27**).

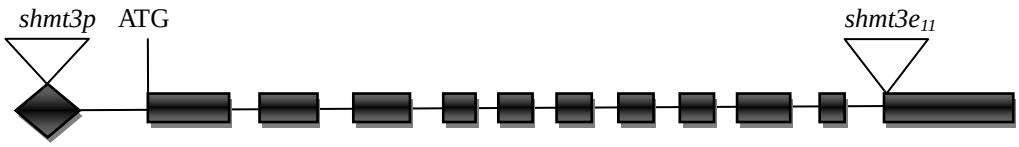


Figure 27: Structure du gène *SHMT3* et position des insertions dans les lignées *shmt3p* et *shmt3e$_{11}$* (le losange symbolise le promoteur, les rectangles symbolisent les exons, les lignes symbolisent les introns). Taille du gène : 3394 pb.

Des travaux antérieurs à ce travail de thèse réalisés dans l'équipe ont montré que seules des plantes hétérozygotes pour l'insertion d'ADN-T étaient retrouvées pour la lignée *shmt3p* tandis que des plantes homozygotes ont bien pu être identifiées pour la lignée *shmt3e$_{11}$*.

Afin d'étudier l'impact de l'insertion d'ADN-T sur l'expression du gène *SHMT3*, une expérience de RT-PCR à partir d'ARN totaux extraits de plantules homozygotes *shmt3e$_{11}$* de 72h avec les amorces ZY003 et ZY004 spécifiques de l'ARNm *SHMT3* a été réalisée.

Il a été constaté que le gène *SHMT3* est toujours exprimé chez les plantes de la lignée *shmt3e$_{11}$* (**Figure 28**). Il apparait donc que l'insertion d'ADN-T dans le dernier exon du gène *SHMT3* n'entraine pas de perte de l'expression du transcrit.

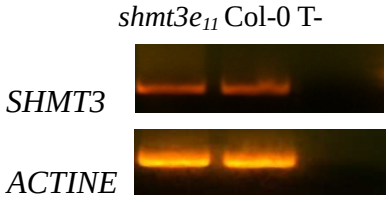


Figure 28: Analyse de l'expression du gène *SHMT3* chez des plantules *shmt3e$_{11}$* et Col-0. L'expression du gène *ACTINE* (amorces PCR SR68 et SR69) sert de contrôle positif. T-: contrôle négatif sans matrice ARN.

1.4 Conclusion

Des plantules de 72 h du mutant faible *shmt1-1* ont une teneur réduite en γ-BB et en carnitine totale par rapport à des plantules sauvages. Cette différence de teneur en carnitine ne semble pas avoir d'influence sur la teneur en différentes acyl-carnitines analysées et sur la teneur totale en ces molécules. Dans le cadre de ces travaux de thèse aucun mutant perte de fonction des protéines SHMT2 et SHMT3 n'a pu être étudié.

2. Protéines THA

La famille des thréonines aldolases chez *A. thaliana* comprend deux membres, les protéines THA1 et THA2. Ces enzymes sont identiques à plus de 34 % avec les protéines HTMLA humaine et GLY1 de *C. albicans* en terme de séquences. Des mutants de ces deux protéines ont été caractérisés (Jander *et al.*, 2004, Joshi *et al*., 2006， Ajjawi *et al*., 2010) et étaient disponibles pour une étude de leur implication éventuelle dans la synthèse de carnitine.

2.1 Etude du mutant *tha1-1*

Seul le mutant *tha1-1*, mutant faible, a pu être étudié dans la mesure où les graines obtenues du mutants *tha1-2*, perte de fonction du gène *THA1* par insertion d'un ADN-T, n'ont pas germé dans le cadre de cette étude. Le mutant *tha1-3* n'a pas été choisi car il contient une deuxième insertion dans le gène *IAA3* qui régule la réponse à l'auxine dans les racines (Ajjawi *et al*., 2010).

Le mutant *tha1-1* porte une mutation ponctuelle (**Figure 29**) dans le premier exon de la séquence du gène changeant un acide aminé glycine en arginine (Joshi et *al.*, 2006).

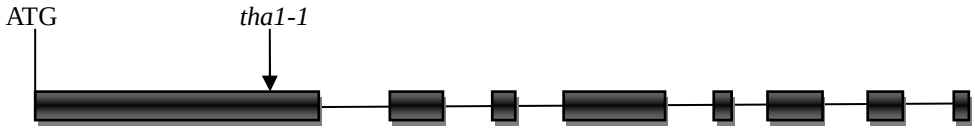


Figure 29: Structure du gène *THA1* et position de la mutation *tha1-1* (les rectangles symbolisent les exons, les lignes symbolisent les introns). Taille du gène : 3179 pb.

Afin d'étudier le lien éventuel entre l'enzyme THA1 et la synthèse de la carnitine chez *A. thaliana*, une analyse de la teneur en γ-BB et carnitine par LC-ESI-MS/MS a été initiée sur des extraits de plantules *tha1-1* et Col-0 de 72 h cultivées sur milieu M&S.

2.1.1 Analyse de la teneur en γ-BB

La teneur moyenne en γ-BB de plantules *tha1-1* est réduite de 13,8 % par rapport à des plantules sauvages (**Figure 30**). En effet les plantules du mutant contiennent en moyenne 2,613 ± 0,316 ng.mg^{-1} MS de γ-BB contre 3,033 ± 0,456 ng.mg^{-1} MS pour les plantules Col-0. Mais, dans ces expériences la diminution observée entre les plantules de génotype sauvage et mutant n'est pas significative au regard des écarts-types obtenus.

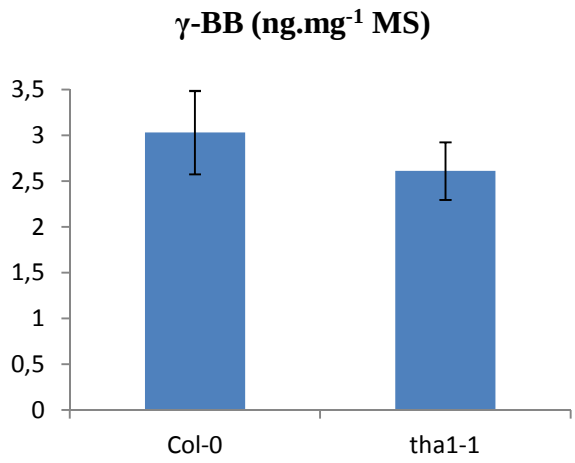


Figure 30: Teneur en γ-BB dans des extraits de plantules d'*A. thaliana* Col-0 et *tha1-1* de 72 h cultivées sur milieu M&S (MS: matière sèche). Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions biologiques indépendantes (± l'écart-type).

2.1.2 Analyse de la teneur en carnitine

Ces mêmes extraits végétaux ont été analysés d'un point de vue de la teneur en carnitine libre. Celle-ci est comparable entre les plantules du mutant *tha1-1* et les plantules sauvages (0,284 ± 0,051 ng.mg^{-1} MS et 0,295 ± 0,053 ng.mg^{-1} MS respectivement) (**Figure 31**).

Une saponification a également été faite sur des extraits végétaux afin de libérer la fraction de la carnitine potentiellement liée et quantifier la carnitine totale. Là encore la teneur en carnitine totale dans les extraits de *tha1-1* et dans les extraits de Col-0 est comparable (0,662 ± 0,146 ng.mg^{-1} MS et 0,602 ± 0,124 ng.mg^{-1} MS respectivement) (**Figure 31**).

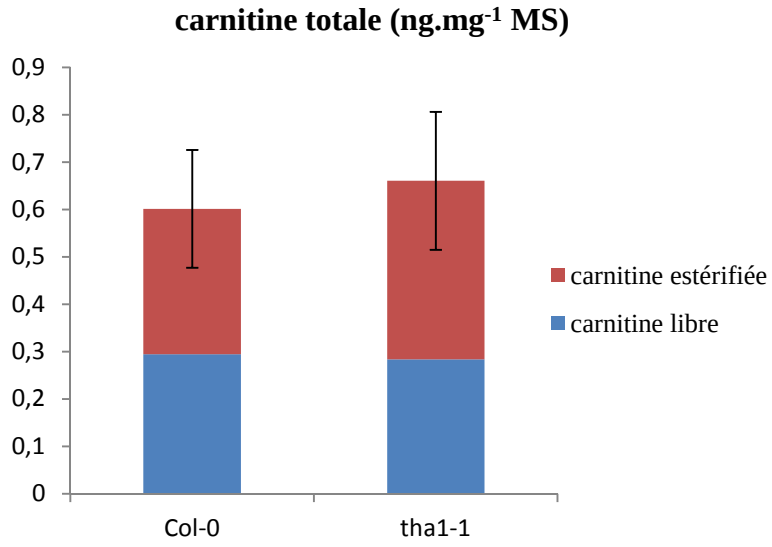


Figure 31: Teneur en carnitine libre et estérifiée dans des extraits de plantules d'*A. thaliana* Col-0 et *tha1-1* de 72 h cultivées sur milieu M&S (MS: matière sèche). Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions biologiques indépendantes (± l'écart-type).

2.1.3 Analyse de la teneur en acyl-carnitines

Une quantification de la teneur en différentes acyl-carnitines a également été réalisée sur des extraits végétaux obtenus à partir de plantules de 72 h Col-0 et *tha1-1*.

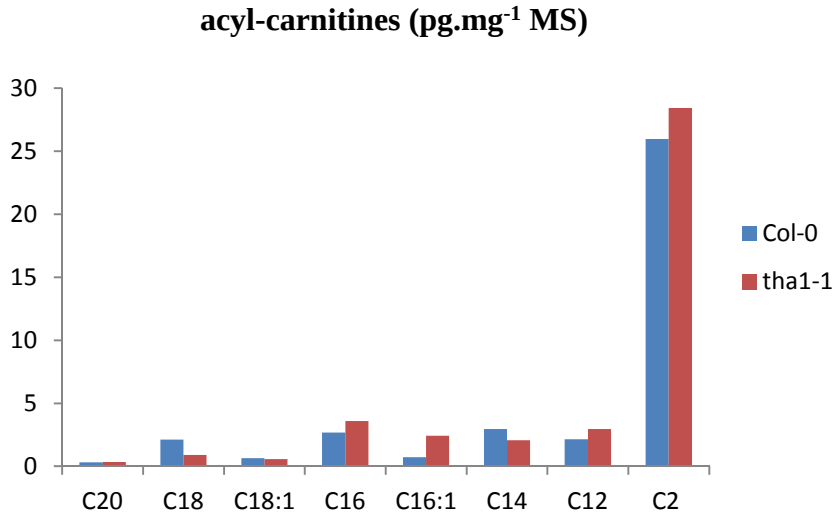


Figure 32: Teneurs en acyl-carnitines des plantules d'*A. thaliana* Col-0 et *tha1-1* de 72 h cultivées sur milieu M&S (MS: Matière Sèche) (C20: arachidoyl-canitine, C18: stéaroyl-carnitine, C18:1: oléoyl-carnitine, C16: palmitoyl-carnitine, C16:1:

palmitoleoyl-carnitine, C14: myristoyl-carnitine, C12: lauroyl-carnitine, C2: acétyl-carnitine).

Les teneurs en différentes acyl-carnitines d'extraits de plantules *tha1-1* et Col-0 ne semblent pas présenter de différence significative (**Figure 32**). D'autre part, la quantité totale d'acyl-carnitines analysées est de 41,3 pg.mg^{-1} MS pour le génotype *tha1-1* et 37,5 pg.mg^{-1} MS pour le génotype sauvage dans cette expérience. Une répétition biologique indépendante a donné des résultats comparables (38,1 pg.mg^{-1} MS d'acyl-carnitines dans les extraits de *tha1-1* contre 35,7 pg.mg^{-1} MS dans les extraits de Col-0). Aucune différence significative de la teneur totale en acyl-carnitines n'a donc été constatée entre les deux génotypes. Là encore les différentes acyl-carnitines analysées ne représentent qu'environ 10 à 12 % de la fraction de carnitine libérée par saponification (**Figure 31**).

2.2 Etude de mutants perte de fonction de THA2

Concernant l'enzyme THA2, des mutants contenant des insertions d'ADN-T dans le premier et troisième intron du gène correspondant ont été identifiés (**Figure 33**) (Joshi *et al*., 2006). Ces insertions doivent être maintenues à l'état hétérozygote, soit *THA2-1*/*tha2-1* et *THA2-2*/*tha2-2*. En effet les graines homozygotes pour ces mutations sont albinos (**Figure 34**) et arrêtent leur développement après la sortie des cotylédons (Joshi *et al*., 2006). Les deux lignées ont été utilisées dans le cadre de la recherche de protéines impliquées dans la synthèse de carnitine chez Arabidopsis.

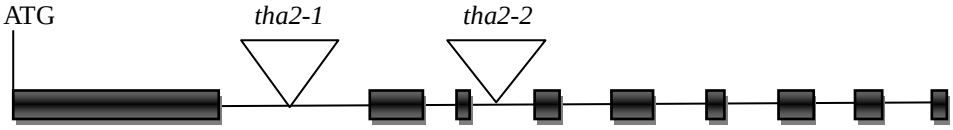
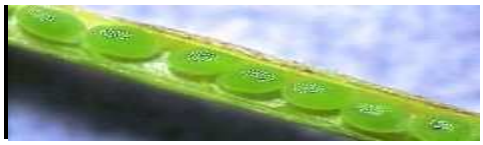


Figure 33: Structure du gène *THA2* et position des insertions dans les lignées *tha2-1* et *tha2-2* (le losange symbolise le promoteur, les rectangles symbolisent les exons, les lignes symbolisent les introns). Taille du gène : 2521 pb.

(A)







(B) (C)

Figure 34: Graines dans leur silique issues de plantes de génotype Col-0 (A), *THA2-1/tha2-1* (B) *et THA2-2/tha2-2* (C) (grossissement x 30).

2.2.1 Effet d'un apport exogène de carnitine sur la germination et le développement de plantules hétérozygotes

D'après les données de la littérature, il n'est pas possible de restaurer la viabilité des plantules *tha2-1* et *tha2-2* par des apports exogènes en différents acides aminés (qu'il s'agisse de Met, Lys, Lys et Met, Thr, Ile ou Gly) dans le milieu de culture des plantes (Joshi et *al.*, 2006). Dans le cadre de notre étude, la protéine THA2 est envisagée comme pouvant intervenir dans la synthèse de l'acide aminé carnitine. Aussi un lien pourrait exister entre la teneur en carnitine des plantules et leur non viabilité. Afin de tester cette hypothèse une expérience d'apport exogène en carnitine à la concentration de 5 mM dans le milieu de culture utilisé pour la germination et le développement de plantules issues de plantes hétérozygotes pour les insertions dans le gène *THA2* a été initiée (**Figure 35**). Cette concentration en carnitine dans le milieu est sans effet délétère pour le développement des plantules d'Arabidopsis (Charrier *et al.*, 2012).

THA2-1/tha2-1



MS (A) MS+carnitine (B)

THA2-2/*tha2-2*



MS (C) MS+carnitine (D)

Figure 35: Plantules d'*A. thaliana THA2-1*/*tha2-1* (A, B) et *THA2-2*/*tha2-2* (C, D) cultivées sur milieu M&S et M&S supplémenté en carnitine (5mM) après 7 jours de développement (le cercle rouge indique les plantules dont le développement est arrêté).

Que les plantules issues de graines provenant de plantes de génotype *THA2-1*/*tha2-1* ou *THA2-2*/*tha2-2* soient cultivées sur M&S ou M&S supplémenté en carnitine, 23 à 26 % d'entre elles sont arrêtées au stade dicotylédonaire. La carnitine ne semble donc pas avoir d'effet favorable sur le développement post-germinatif des mutants *tha2* homozygotes lorsqu'elle est ajoutée au milieu de culture.

2.2.2 Dosage de la carnitine chez les mutants *tha2-1* et *tha2-2*

Dans la mesure où le phénotype des plantules homozygotes pour les insertions d'ADN-T dans le gène *THA2* est facilement identifiable, une expérience de dosage de la carnitine a été réalisée. Des graines issues de plantes hétérozygotes ont donc été semées sur du milieu de croissance M&S. Après 72 h, les plantules ayant arrêté leur développement (homozygotes *tha2-1/tha2-1, tha2-2/tha2-2*) et les plantules présentant un développement normal (*tha2-1*/*THA2-1*, *THA2-1/THA2-1* et *tha2-2/THA2-2*, *THA2-2/THA2-2*) ont été récoltées séparément. Un comptage a permis de vérifier le ratio 25/75 de plantules homozygotes par rapport aux plantules hétérozygotes et sauvages sur le critère d'arrêt de développement. Une

extraction de la carnitine libre a été réalisée et quantifiée par spectrométrie de masse (**Tableau 20**).

Tableau 20: Teneur en carnitine de plantules issues de plantes hétérozygotes *THA2-1/tha2-1* et *THA2-2/tha2-2* après 72 h de culture sur milieu M&S.

	Col-0	*THA2-1/tha2-1* *THA2-1/THA2-1*	*tha2-1/tha2-1*	*THA2-2/tha2-2* *THA2-2/THA2-2*	*tha2-2/tha2-2*
Carnitine ng.mg^{-1} MS	0,21	0,48	**1,07**	0,18	**1,01**

Les résultats montrent que la teneur en carnitine libre est plus élevée (plus de 1 ng.mg MS^{-1}) chez les plantules homozygotes pour les insertions d'ADN-T dans le gène *THA2* que les plantules de génotype hétérozygote ou sauvage. Une répétition biologique indépendante de cette expérimentation a confirmé ce résultat.

La faible quantité de matériel biologique obtenue n'a pas permis de quantifier également la γ-butyrobétaïne chez les mutants *tha2-1* et *tha2-2*.

2.3 Conclusion

Le mutant faible *tha1-1* ne présente pas de diminution significative de la teneur en γ-BB et en carnitine libre ou totale.

Concernant la protéine THA2, deux mutants perte de fonction de *THA2* ont été analysés. Un apport exogène de carnitine dans le milieu de culture utilisé pour la germination et le développement des graines ne permet pas de restaurer la viabilité des plantules homozygotes pour les mutations dans le gène *THA2*. D'autre part, une analyse de la carnitine contenue dans des plantules homozygotes montre que sa teneur y est plus de quatre fois plus élevée que dans des plantules sauvages.

3. Discussion et perspectives

La conversion de l'HTML en TMABA, qui constitue la deuxième étape de la voie de biosynthèse de la carnitine chez l'animal et la levure *C. albicans*, n'est pas encore complètement caractérisée. En effet chez l'animal, une sérine hydroxyméthyl transférase est proposée car une enzyme purifiée à partir de foie de lapin est capable de convertir le substrat HTML en TMABA et glycine (Henderson *et al*., 1980; Henderson *et al*., 1982). Chez la levure,

il semble que plusieurs protéines soient impliquées. Une étude génétique et biochimique détaillée a permis de montrer récemment qu'une thréonine aldolase est majoritairement en charge de la conversion de l'HTML en TMABA chez cette levure et est proposée comme étant l'HTMLA (Strijbis *et al.*, 2009). Sur la base de son homologie de séquence avec l'HTMLA la protéine GLY1, une autre thréonine aldolase de levure, est également proposée. Cependant, des mutants perte de fonction de l'HTMLA ou des doubles mutants *htmla/gly1* sont encore capables de pousser sur source de carbone non fermentescible. Une forme de SHMT est donc certainement impliquée à cette étape pour prendre en charge la conversion résiduelle de l'HTML (Strijbis *et al.*, 2010). Sur la base des travaux réalisés chez la levure, une protéine GLY1 est également proposée comme pouvant être une HTMLA chez les rongeurs (Strijbis *et al.*, 2010).

Le génome d'Arabidopsis code pour sept sérine hydroxyméthyltransférases et deux thréonine aldolases dont certaines pourraient également être impliquées dans la synthèse de TMABA et donc indirectement dans la synthèse de carnitine.

Une étude de la teneur en carnitine du mutant faible *shmt1-1* permet de mettre en évidence dans des extraits de plantules de 72 h une teneur réduite en γ-BB d'environ 29,8 % par rapport aux plantes sauvages qui pourrait expliquer la diminution de la teneur en carnitine totale (fraction libre et fraction estérifiée) d'environ 28,1 % mesurée sur les mêmes extraits. Cette réduction n'est pas accompagnée d'une diminution de la teneur en acyl-carnitines qui ne représentent que 8,6 à 12,7 % de la carnitine estérifiée, elle-même réduite de 24,3 %. A ce stade il n'est pas possible de conclure sur l'implication de la protéine SHMT1 d'Arabidopsis dans la synthèse de carnitine. En effet la diminution observée peut être une conséquence du phénotype développemental du mutant ou d'une réelle implication de l'enzyme dans la biosynthèse de la TMABA. Une analyse fonctionnelle de l'activité de la protéine serait indispensable pour déterminer si elle catalyse la conversion de l'HTML en TMABA. D'après les données bibliographiques, seul le substrat glycine a été testé (Voll *et al.*, 2006; Jamai *et al.*, 2009; Engel *et al.*, 2011). Il pourrait être envisagé de produire l'enzyme végétale dans un système d'expression bactérien, pour la purifier et tester son activité *in vitro* sur le substrat HTML. Il serait également envisageable d'isoler la séquence codante du gène *SHMT1* et de réaliser une expérience de complémentation de mutant de levure dépourvu d'enzyme HTMLA afin de voir si l'enzyme végétale peut restaurer la viabilité de la levure cultivée dans un milieu contenant des acides gras comme unique source de carbone (Strijbis *et al.*, 2009).

Comme indiqué ci-dessus la fraction d'acyl-carnitines quantifiée dans nos analyses d'extraits de plantules d'Arabidopsis ne représente que 8,6 à 12,7 % de la carnitine estérifiée dans la mesure où seules les molécules pour lesquelles nous avons des standards sont suivies en

LC-ESI-MS/MS. Pour avancer dans la connaissance sur le rôle biologique de la carnitine chez les plantes, une identification des molécules susceptibles de s'y lier par sa fonction hydroxyle sera nécessaire (qu'il s'agisse d'AG ou non) et pourra être réalisée en spectrométrie de masse à temps de vol (TOF-MS).

La fonction proposée pour la protéine SHMT1 est la conversion réversible de la serine en glycine en combinaison avec la glycine décarboxylase par la photorespiration dans les mitochondries du mésophylle foliaire. Un lien entre la photorespiration et la carnitine ne peut pas être exclu. En effet, récemment, la protéine BOU d'Arabidopsis, homologue à un transporteur d'acyl-carnitines de mammifère (Lawand *et al.*, 2002), a été proposée comme transporteur mitochondrial impliqué dans la photorespiration (Eisenhut *et al.*, 2013).

La localisation proposée pour l'enzyme SHMT1 d'Arabidopsis est mitochondriale. Si cette enzyme est impliquée dans la synthèse de carnitine cela implique une localisation cellulaire différente de l'enzyme qui est proposée chez l'homme pour être l'HTMLA qui serait cytosolique au regard des données sur l'activité de l'enzyme (Rebouche et Engel, 1980). Il est possible également qu'une autre enzyme SHMT d'Arabidopsis à la localisation différente ait un rôle dans la voie de biosynthèse de la carnitine. Malheureusement dans le cadre de ces travaux de thèse aucun mutant perte de fonction des protéines SHMT2 et SHMT3 n'a pu être étudié. Il sera nécessaire de rechercher d'autres lignées candidates pour étudier une éventuelle implication des autres SHMT dans la synthèse de carnitine. Toutefois il est possible qu'une mutation perte de fonction de la protéine SHMT3 présente un caractère létal dans la mesure où seules des plantes hétérozygotes ont été obtenues pour la lignée *shmt3p* (SALK _022634) qui contient une insertion d'ADN-T dans le promoteur du gène.

Aucune réduction de la teneur en carnitine n'a été mise en évidence chez le mutant *tha1-1*, malgré une réduction de la teneur en γ-BB de 13,8 % par rapport aux plantes sauvages. Il serait intéressant d'étudier les teneurs en carnitine et précurseurs chez le mutant *tha1-2* perte de fonction du gène *THA1*. Une implication de la protéine THA1-1 ne peut pas être totalement exclue dans la mesure où le produit de son activité éventuelle, la TMABA, indisponible commercialement pour être utilisée comme standard, n'a pas été mesurée ici. Une analyse fonctionnelle de l'activité de cette enzyme pourrait également être envisagée dans la mesure où il n'y a pas de donnée dans la littérature portant sur des tests d'activité de l'enzyme THA1 sur différents substrat.

La carnitine n'a pas d'effet bénéfique sur le développement de plantules perte de fonction de la protéine THA2 lorsqu'elle est ajoutée au milieu de culture. Ceci n'est pas dû à un problème d'accumulation de la carnitine dans les plantules car nos données antérieures

montrent qu'à la concentration de 5 mM dans le milieu de culture, la carnitine s'accumule à raison de 8,1 mM contre 0,2 µM sans apport exogène (Charrier *et al.*, 2012). Par contre on ne peut exclure le fait que la carnitine pourrait ne pas être disponible dans un ou plusieurs organites subcellulaires où elle serait primordiale. Cependant, une quantification de la carnitine des plantules *tha2-1* et *tha2-2* montre au contraire une accumulation de carnitine 4 à 5 fois plus élevée que chez les plantules sauvages. Ceci va dans le sens d'une synthèse de carnitine associée à la mutation. Cette teneur élevée peut cependant s'expliquer par l'arrêt de développement des plantules et donc par une différence de stade de développement entre les plantules mutées et les plantules sauvages au moment de l'analyse. En effet les plantules d'Arabidopsis contiennent plus de carnitine libre aux stades de développement précoce (Charrier *et al.*, 2012). Ces résultats ne mettent pas en évidence de lien entre l'enzyme THA2 et la carnitine.

Chapitre V – ETUDE DE L'IMPLICATION DES ENZYMES D'ARABIDOPSIS HOMOLOGUES AUX TMABADH DANS LA SYNTHESE DE CARNITINE

Des enzymes de la famille des aldéhydes déshydrogénases (ALDH) d'*A. thaliana* sont homologues aux TMABADH humaine et de la levure *C. albicans* impliquées dans la synthèse du précurseur direct de la carnitine chez ces organismes (**Figure 8**, chapitre I). Ainsi les ALDH de la famille 2 présentent une identité de séquence de 36 % à 39 % avec la protéine animale et de 46 % à 48 % avec la protéine de levure. De même les enzymes de la famille 10 ont une identité de séquence de 38 % et 39 % avec la protéine humaine et de 42 % avec celle de levure. Sur la base de ces homologies, ces protéines végétales pourraient également être impliquées dans la synthèse de l'acide aminé carnitine chez Arabidopsis. Des lignées mutantes avérées ou non caractérisées mais portant une insertion d'ADN-T dans les gènes codant pour ces enzymes sont disponibles (**Tableaux 18**, **19**, chapitre III). Ces lignées ont été étudiées afin d'envisager une éventuelle implication des protéines dans la synthèse de la carnitine chez *A. thaliana*.

1. Protéines ALDH2

1.1 Etude des mutants pertes de fonction des protéines ALDH2B4, ALDH2B7 et ALDH2C4

La famille des protéines ALDH2 chez Arabidopsis compte trois membres: les protéines ALDH2B4, ALDH2B7 et ALDH2C4. Des mutants perte de fonction ont été caractérisés pour ces trois protéines. Il s'agit des lignées *aldh2B4-1, aldh2B4-2, aldh2B7-1, aldh2C4-1* et *aldh2C4-2* toutes homozygotes pour une insertion d'ADN-T dans les gènes *ALDH2B4, ALDH2B7, ALDH2C4* comme décrit dans la **figure 36** (Wei *et al*., 2009).

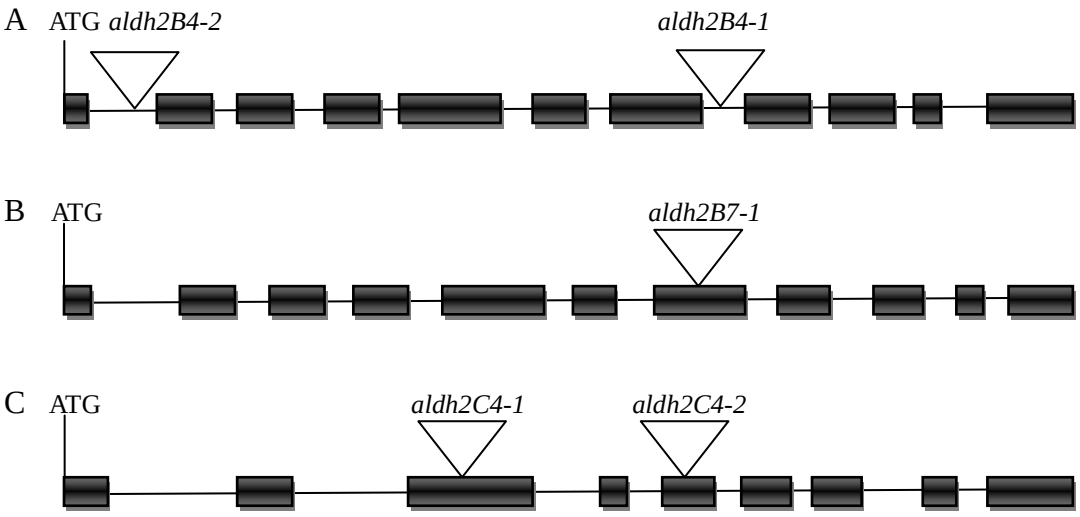


Figure 36: Structure du gène (A) *ALDH2B4, (B) ALDH2B7* et *(C) ALDH2C4* et position des insertions d'ADN-T chez les mutants *aldh2B4-1, aldh2B4-2, aldh2B7-1, aldh2C4-1, aldh2C4-2* (les rectangles symbolisent les exons, les lignes symbolisent les introns). Taille des gènes : A : 3154 pb; B: 2829 pb; C: 3514 pb.

Une quantification de la teneur en carnitine de ces lignées a été faite sur des extraits de plantules d'Arabidopsis de 72 h et comparée à celle d'un extrait de plantules Col-0 (**Tableau 21**). Les résultats obtenus ne révèlent pas de diminution de la teneur en carnitine dans les extraits provenant de plantules portant une mutation perte de fonction du gène *ALDH2C4*. Une diminution sensible de la teneur en carnitine a pu être mise en évidence au cours d'une expérimentation sur les génotypes *aldh2B4-1* (0,160 ng.mg^{-1}MS de carnitine) et *aldh2B7-1* (0,290 ng.mg^{-1}MS de carnitine) par rapport à l'extrait de plantules sauvages (0,54 ng.mg^{-1}MS de carnitine). Cependant le résultat concernant la mutation de la protéine ALDH2B4 n'a pas été confirmé au cours d'une répétition biologique indépendante et de l'analyse de la teneur en carnitine d'un extrait de plantules *aldh2B4-2*. De plus, une analyse de la teneur en carnitine d'un extrait de plantules du double mutant *aldh2B4-1; aldh2B7-1* met en évidence au contraire une augmentation de la teneur en carnitine par rapport à un extrait de plantules sauvages.

Tableau 21: Analyse de la teneur en carnitine libre dans des extraits de plantules de 72 h de différents génotypes (les valeurs indiquées en gras ont été obtenues à partir d'une expérience indépendante).

Génotype	Carnitine libre ($ng.mg^{-1}$ MS)
Col-0	0,54 - **0,321**
aldh2C4-1	0,45 - **0,514**
aldh2C4-2	0,380
aldh2B4-1	0,160 - **0,555**
aldh2B4-2	0,490
aldh2B7-1	0,290
aldh2B4-1 ; aldh2B7-1	3,3

1.2 Conclusion

Les protéines ALDH2 ne semblent pas être impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine chez Arabidopsis.

2. Protéines ALDH10

Le génome d'Arabidopsis code pour deux protéines ALDH10. Il s'agit des protéines ALDH10A8 et ALDH10A9, identiques à plus de 70 % aux protéines ALDH10 de pois (Rippa *et al.*, 2012) capables d'oxyder, parmi d'autres substrats, le TMABA en γ-BB *in vitro* (Tylichova *et al.*, 2010). Une attention particulière est donc portée sur ces protéines qui pourraient être impliquées dans la synthèse du précurseur de la carnitine chez Arabidopsis à l'instar des animaux et de la levure.

Un mutant perte de fonction de la protéine ALDH10A8 a été décrit (Missihoun *et al.*, 2011). Ce mutant, nommé *KO8-2*, peut donc être étudié d'un point de vue de sa teneur en carnitine et en γ-BB. Par contre, à ce jour, aucun mutant perte de fonction de la protéine ALDH10A9 n'a été caractérisé. En effet l'expression du gène *ALDH10A9* n'est pas affectée par une insertion d'ADN-T dans le dixième intron (lignée SALK_066181) ou dans le promoteur (lignée SAIL_502_G10) du gène (Missihoun *et al.*, 2011). Il est donc nécessaire de rechercher un mutant de cette protéine pour étudier son rôle éventuel dans la voie de biosynthèse de la carnitine.

2.1 Etude du mutant *KO8-2*

Le mutant *KO8-2* est issu de la collection d'insertion d'ADN-T Saskatoon (SK24056, Robinson *et al.*, 2009). Il contient un ADN-T dans le douzième intron du gène *ALDH10A8* (**Figure 37**) et a été obtenu auprès de la banque NASC.

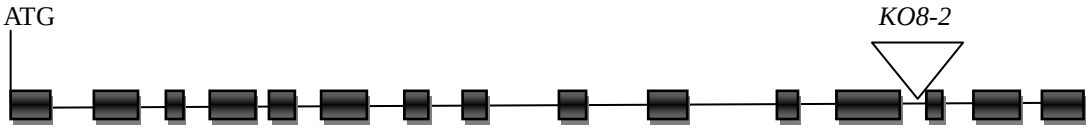


Figure 37: Structure du gène *ALDH10A8* et position de l'insertion d'ADN-T chez le mutant *KO8-2*. Taille du gène : 3736 pb.

Une lignée homozygote pour la mutation a été obtenue à l'aide d'un génotypage par PCR fait avec les amorces AY093071_RT_fwd, AY093071_RT_rev et pSKTAIL-L3 sur de l'ADN de plantules. Une expérience de RT-PCR réalisée à partir d'ARN totaux extraits de plantules de 72 h (amorces AY093071_RT_fwd, AY093071_RT_rev) a confirmé l'absence d'expression du gène *ALDH10A8* (**Figure 38**).

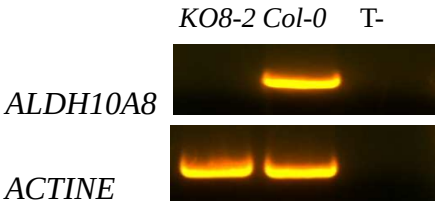


Figure 38: Analyse de l'expression du gène *ALDH10A8* dans des plantules *KO8-2* et Col-0. L'expression du gène *ACTINE* (amorces PCR SR68 et SR69) sert de contrôle positif. T-: contrôle négatif sans ARN.

2.1.1 Analyse de la teneur en γ-BB

Une analyse de la teneur en γ-butyrobétaïne et en carnitine libre a été réalisée sur des extraits de plantules du mutant *K08-2* et Col-0 de 72 h cultivées *in vitro* sur du milieu M&S par LC-ESI-MS/MS (**Figure 39**).

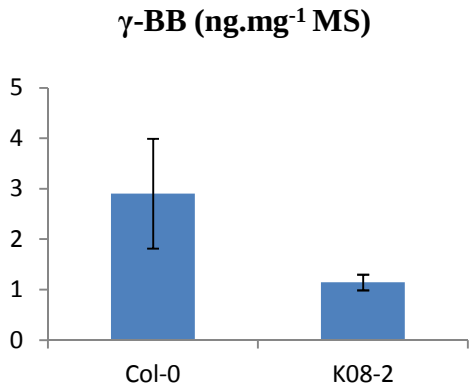


Figure 39: Teneur en γ-BB dans des extraits de plantules d'*A. thaliana* Col-0 et *K08-2* de 72 h cultivées sur du milieu M&S (MS: matière sèche). Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions biologiques indépendantes.

Les résultats indiquent que la teneur moyenne en γ-BB dans des extraits de plantules *K08-2* est réduite de 61 % par rapport à des extraits obtenus à partir de plantules sauvages. En effet les plantules du mutant *K08-2* contiennent en moyenne 1,143 ± 0,156 ng.mg^{-1} MS de γ-BB chez *K08-2* contre 2,903 ± 1,089 ng.mg^{-1} MS chez Col-0.

2.1.2 Analyse de la teneur en carnitine

Ces mêmes extraits végétaux ont été analysés d'un point de vue de la teneur en carnitine libre. Elle est de 0,272 ± 0,131 ng.mg^{-1} MS dans des plantules *K08-2* de 72 h contre 0,568 ± 0,298 ng.mg^{-1} MS chez Col-0, soit une réduction de 52 % chez le mutant (**Figure 40**).

En parallèle, une saponification a été faite sur des extraits végétaux de plantules *K08-2* et Col-0 de 72 h cultivées dans les mêmes conditions afin de libérer la fraction de la carnitine estérifiée notamment avec les chaines acyles et acétyle et quantifier la carnitine totale (**Figure 40**).

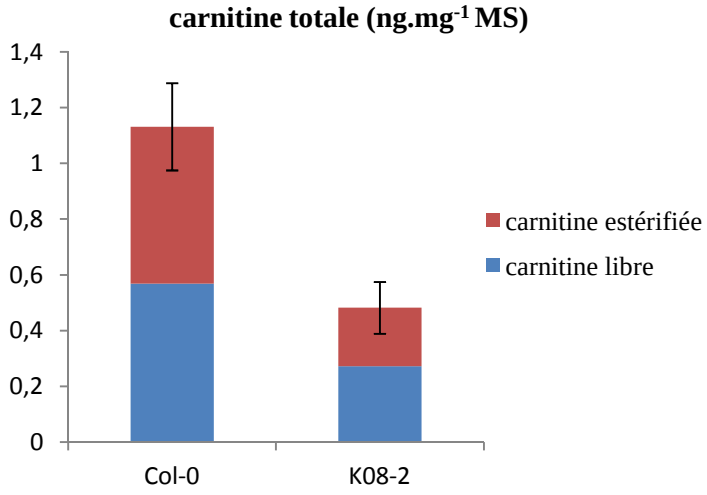


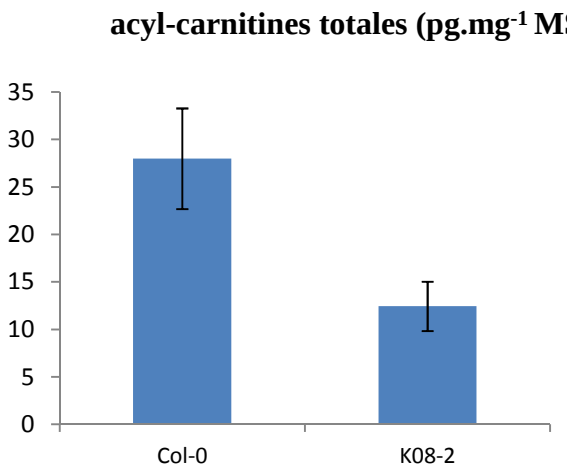
Figure 40: Teneur en carnitine libre et estérifiée dans des extraits de plantules d'*A. thaliana* Col-0 et *K08-2* de 72 h cultivées sur milieu M&S (MS: matière sèche). Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions biologiques indépendantes (± l'écart-type concernant les valeurs de la carnitine totale).

La teneur en carnitine totale est diminuée de 2,3 fois dans des extraits de plantules *KO8-2* par rapport à des extraits de plantules sauvages. En effet elle n'est que de 0,482 ± 0,039 ng.mg^{-1} MS contre 1,132 ± 0,156 ng.mg^{-1} MS chez Col-0, soit 57 % de carnitine en moins. De la même manière, la carnitine estérifiée est réduite de 63 % (2,6 fois) chez le mutant (0,210 ± 0,061 ng.mg^{-1} MS de carnitine estérifiée contre 0,564 ± 0,076 ng.mg^{-1} MS chez Col-0).

2.1.3 Analyse de la teneur en acyl-carnitines

Une quantification de la teneur en différentes acyl-carnitines de longueur de chaine carbonée variable a également été réalisée sur des extraits végétaux obtenus à partir de plantules de 72 h chez Col-0 et *K08-2* par LC-ESI-MS/MS (**Figure 41**).

A



B

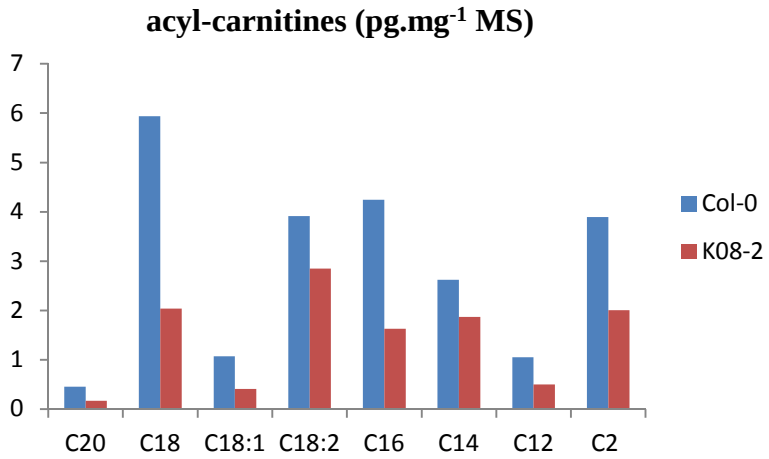


Figure 41: Teneurs en acyl-carnitines de plantules d'*A. thaliana* Col-0 et *K08-2* de 72 h cultivées sur milieu M&S (MS: Matière Sèche). A: Teneur totale en acyl-carnitines, les résultats représentent la moyenne de trois répétitions biologiques indépendantes (± l'écart-type). B: Teneur en différentes acyl-carnitines d'un extrait (C20: arachidoyl-canitine, C18: stéaroyl-carnitine, C18:1: oléoyl-carnitine, C18:2: linoléoyl-carnitine, C16: palmitoyl-carnitine, C14: myristoyl-carnitine, C12: lauroyl-carnitine, C2: acétyl-carnitine).

Des extraits de plantules *K08-2* de 72 h présentent une diminution de 56 % en acyl-carnitine en comparaison d'extraits obtenus à partir de plantules sauvages (12,4 ± 2,6 pg.mg^{-1} MS contre 27,9 ± 5,2 pg.mg^{-1} MS) (**Figure 41, A**). Les acyl-carnitines libérées par saponification représentent 6 % de la carnitine estérifiée chez *KO8-2* et 5 % chez le mutant Col-0, soit une proportion équivalente. La diminution est retrouvée pour tous les groupements acyles analysés. Ainsi les teneurs en C18-carnitine, C16-carnitine et en acétyl-carnitine sont

réduites de moitié chez *KO8-2* (**Figure 41, B**).

2.1.4 Analyse de la teneur en glycine bétaïne

Les enzymes ALDH10 (BADH) sont également proposées comme étant responsables de la deuxième étape de la synthèse de l'osmoprotectant glycine bétaïne (GB) chez les plantes (Rathinasabapathi *et al.*, 1997). Arabidopsis n'est pas une plante qui accumule la GB en condition de stress salin ou osmotique, et pourtant son génome code pour deux BADH. Afin de voir si l'enzyme ALDH10A8 peut-être impliquée dans la synthèse de GB, des extraits de plantules de 3 jours *KO8-2* et Col-0 ont été analysés au cours d'une expérience par LC-ESI-MS/MS. La teneur en GB obtenue à partir de plantules *KO8-2* était de 15,82 ng.mg MS^{-1} contre 10,93 ng.mg MS^{-1} dans un extrait de plantules sauvages. La perte de fonction du gène *ALDH10A8* ne semble donc pas entraîner de diminution de la quantité de GB dans les plantes.

2.1.5 Etude du développement précoce du mutant *K08-2*

Afin de voir si les réductions de teneur en carnitine libre ou estérifiée ont un effet sur le développement précoce du mutant *KO8-2*, un suivi de la germination et du développement post-germinatif a été réalisé. Le résultat montre que le pouvoir germinatif des graines n'est pas modifié chez ce mutant par rapport aux graines Col-0 (**Figure 42**). En effet, après 24 h, 97 % des graines *K08-2* et 95,4 % des graines Col-0 germent. Après 72 h, 94,7 % des plantules *K08-2* et 94,3 % des plantules Col-0, présentent des cotylédons ouverts.

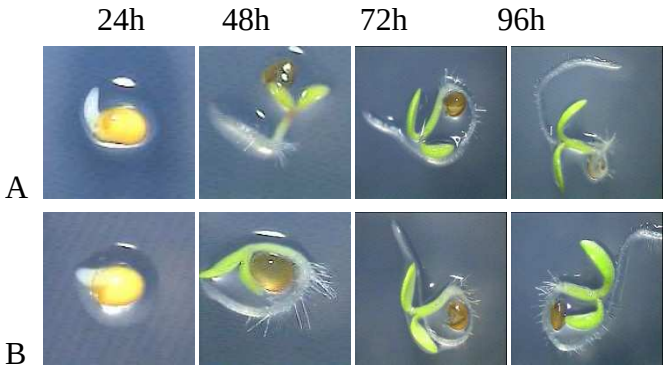


Figure 42: Suivi de la germination et du développement post-germinatif des plantules sauvages d'*A. thaliana* Col-0 (**A**) et du mutant *K08-2* (**B**) sur milieu M&S.

2.1.6 Conclusion

Le mutant *KO8-2*, perte de fonction du gène *ALDH10A8*, présente une réduction de la teneur en γ-BB de 61 % et en carnitine totale de 57 % par rapport au génotype sauvage. Ces modifications entrainent une réduction de la teneur en carnitine estérifiée de 63 % et en acyl-carnitines de 56 % par rapport à des plantules sauvages. Les phénotypes biochimiques mis en évidence n'ont pas d'effet sur le développement précoce des plantules. La teneur en GB n'est pas affectée chez le mutant *KO8-2*.

2.2 Protéine ALDH10A9

Il n'y a pas de mutant perte de fonction de la protéine ALDH10A9 décrit dans la littérature qui permettrait une étude de l'implication de l'enzyme dans la voie de biosynthèse de la carnitine. Aussi une recherche de mutant d'insertion a été initiée.

2.2.1 Recherche d'un mutant perte de fonction du gène *ALDH10A9*

Les lignées *10A9e$_1$* (SAIL_543_H01) et *10A9$_{3'}$*(SALK _148085) contenant des insertions d'ADN-T dans le premier exon et la partie 3' non codante du gène obtenues auprès du NASC (**Figure 43**) ont été étudiées. Des plantes homozygotes pour ces insertions ont été identifiées par génotypage PCR à l'aide des amorces SR124, SR125 et LB_2 pour *10A9e1* et SR128, SR129 et LBa_1 pour *10A9$_{3'}$*.

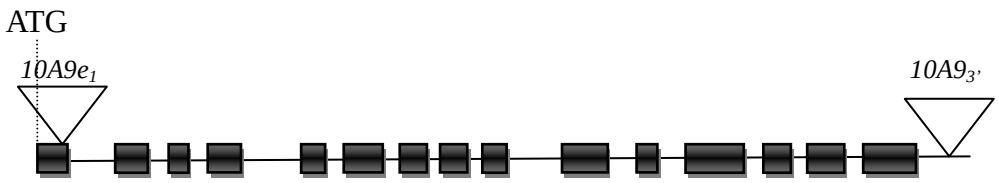


Figure 43: Structure du gène *ALDH10A9* et position des insertions d'ADN-T dans les lignées *10A9e$_1$* et *10A9$_{3'}$* (les rectangles symbolisent les exons, les lignes symbolisent les introns). Taille du gène : 3869 pb.

Une expérience de RT-PCR a été réalisée sur des ARN totaux extraits de plantules *10A9e$_1$* de 72 h avec les amorces AF370333_RT_fwd et AF370333_RT_rev spécifiques de l'ARNm *ALDH10A9* (**Figure 44**). Cette expérience montre que le gène *ALDH10A9* est toujours exprimé chez les plantes de la lignée *10A9e$_1$*. Il apparait donc que chez cette lignée, l'insertion d'ADN-T dans le gène *ALDH10A9* n'empêche pas sa transcription.

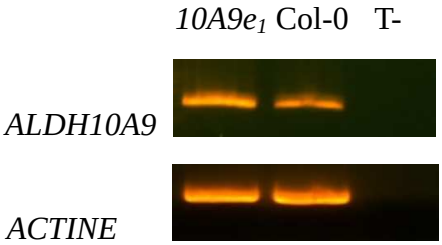


Figure 44: Analyse de l'expression du gène *ALDH10A9* dans des plantules *10A9e$_1$* et Col-0. L'expression du gène *ACTINE* (amorces PCR SR68 et SR69) sert de contrôle positif. T-: contrôle négatif sans ARN.

De la même manière, il a été mis en évidence par RT-PCR que l'insertion d'ADN-T dans la partie non traduite du gène *ALDH10A9* de la lignée *10A9$_{3'}$* n'a pas d'effet sur sa transcription.

Ainsi, quatre lignées contenant une insertion d'ADN-T dans la séquence du gène *ALDH10A9* sont disponibles dans les banques. Cependant pour aucune d'entre-elles, la présence de l'ADN-T, qu'il soit dans le promoteur (SAIL_502_G10), dans le premier exon (SAIL _543_H01) (Missihoun *et al.*, 2011), dans le dixième intron (SALK_066181), ou dans la partie 3' non traduite (SALK _148085) n'entraine une absence d'expression du gène. Ces résultats peuvent laisser supposer une létalité de la perte de fonction du gène *ALDH10A9* qui expliquerait que seules des lignées non dépourvues d'expression soient retrouvées dans les collections de mutants. Aussi une autre approche de mutagénèse a été initiée.

2.2.2 Approche de mutagénèse par expression d'un micro-ARN artificiel ciblant le gène *ALDH10A9*

Une approche de mutagénèse par expression d'un micro-ARN artificiel (*amiRNA*) a été envisagée en utilisant la technique mise au point par l'équipe du Prof. D. Weigel (Ossowski *et al.*, 2008). Cette technique permet d'obtenir des mutants forts ou faibles, c'est-à-dire présentant une expression plus ou moins réduite du transcrit ciblé par expression d'un micro-ARN dans des plantes transgéniques.

Des séquences de micro-ARN spécifiques du gène *ALDH10A9* ont été obtenues à l'aide du site http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi. Il s'agit des *amiRNA1* (TTAGAGGTTTACCGCACTCAA) et *amiRNA2* (TAATGATAGGGCTTTTAGCCC) complémentaires du transcrit du gène *ALDH10A9*. La séquence de l'*amiRNA1* est complémentaire de la séquence comprise entre les bases 383 à 403 de l'ARNm *ALDH10A9*. La séquence de l'*amiRNA2* est complémentaire des bases 875 à 895.

Deux *amiRNA* différents ont été choisis afin de pouvoir vérifier que si des phénotypes sont observés chez les plantes transformées ils sont bien liés à une baisse d'expression du gène cible et non à un effet collatéral sur un autre ARNm. Les deux précurseurs d'*amiRNA* ont été clonés dans le vecteur pENTR1A entre les sites DraI et EcoRV puis vérifiés par séquençage. Ils ont ensuite été introduits dans le plasmide binaire pB7WG2D.1 (Karimi *et al*., 2002) afin de transformer de manière stable des plantes d'Arabidopsis Col-0 via Agrobacterium (Clough et Bent, 1998). Ceci permet une intégration aléatoire d'ADN-T portant les séquences des précurseurs d'*amiRNA* sous le contrôle du promoteur constitutif 35S dans le génome des plantes. La construction choisie permet d'autre part une sélection des graines transgéniques par expression du gène rapporteur *Green Fluorescent Protein* (*GFP*) sous le contrôle du promoteur *rolD* d'*Agrobacterium rhizogenes* qui permet une expression dans tous les organes (Fraisier *et al.*, 2000).

Une mutagénèse par expression d'un micro-ARN permet normalement d'observer les phénotypes associés à la baisse ou l'extinction de l'expression d'un gène sur la première génération de plantes transformées (T1). Dans notre cas, les analyses de teneur en carnitine et γ-BB se font sur des plantules de même génotype âgées de 2 à 3 jours ce qui entraine la destruction du matériel biologique. Une étude de l'effet des micro-ARN artificiels sur la carnitine et son précurseur nécessite donc d'amplifier les plantes de la deuxième génération (T2) pour identifier les homozygotes et semer les graines de la troisième génération (T3) afin de faire les analyses. Les résultats obtenus avec les deux constructions sont donc ici décrits pour les trois générations de plantes transgéniques.

2.2.2.1 Construction *amiRNA1* génération T1

- <u>Sélection des graines transgéniques T1</u>

Après culture des plantes T0 ayant subi le processus de transformation dans la serre, les graines T1 ont été récoltées. Ces graines ont été semées et des plantules de 10 jours ont été traitées par l'herbicide Basta mais aucune plante ne s'est avérée résistante. Par contre au cours de cette expérience des plantules retardées ont été observées (**Figure 45**); compte tenu de ces observations et afin de travailler sur l'ensemble de la population de graines la sélection a ensuite été faite sur le critère de leur fluorescence en microscopie (**Figure 46**).



Figure 45: Plantules T1 de 10 jours issues de la transformation par la construction génétique permettant l'expression de l'*amiRNA1* traitées par un spray d'herbicide Basta (2 %).

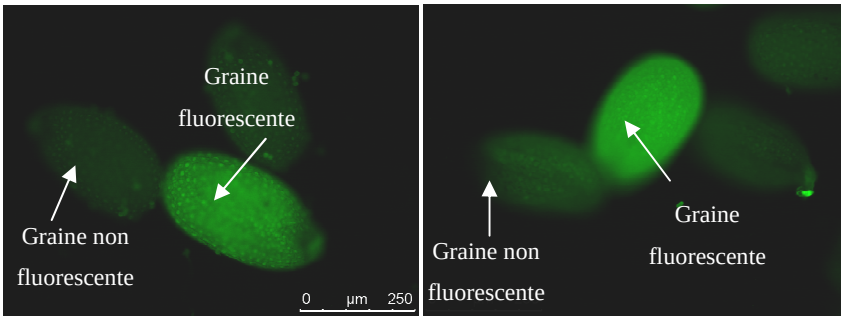


Figure 46: Graines T1 issues de la transformation des plantes d'Arabidopsis à l'aide de la construction permettant l'expression de l'*amiRNA1* (les graines fluorescentes expriment la GFP).

Le pourcentage de graines fluorescentes obtenues est de 0,72 %. Par simplification ces graines fluorescentes ont été nommées *amiRNA1* T1.

- Etude de la germination des graines *amiRNA1* T1

Les graines T1 sélectionnées sur le critère de leur fluorescence ont été semées sur du milieu M&S. 85 graines *amiRNA1* et 80 graines Col-0 ont ainsi été observées et leur développement suivi pendant 10 jours (**Figure 47**).

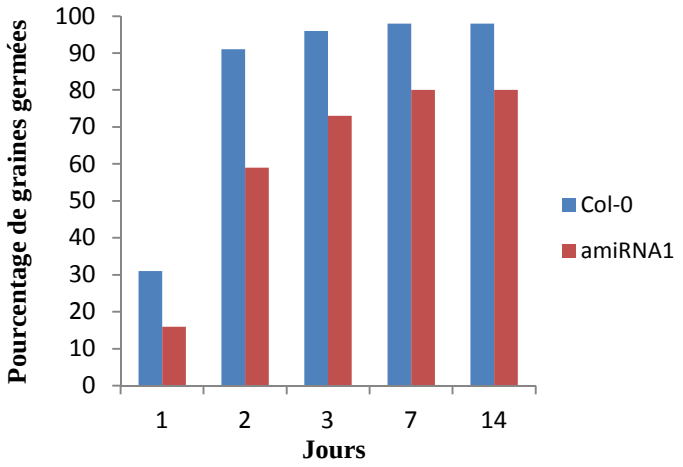


Figure 47: Pourcentage de germination des graines *amiRNA1* T1 et Col-0. Les résultats sont exprimés en pourcentage de graines germées par rapport au nombre total de graines semées.

D'après les résultats, après 24 heures de culture, environ 31 % des graines Col-0 germent (émergence de la radicule) contre seulement 16 % des graines *amiRNA1* T1. Ce résultat est significatif au regard d'un test X^2 ($P < 0,05$). Pour les deux lots de graines, le pourcentage de germination augmente jusqu'au septième jour. Après une semaine, 20 % des graines *amiRNA1* T1 ne germent toujours pas. Il semble donc que la construction permettant l'expression de l'*amiRNA1* affecte le pouvoir germinatif des graines.

- Effet d'un apport exogène de carnitine sur la germination des graines *amiRNA1* T1

Dans le cadre de notre étude, la protéine ALDH10A9 est envisagée comme pouvant intervenir dans la synthèse de la carnitine. Aussi un lien pourrait exister entre la teneur en carnitine des plantules et le plus faible taux de germination constaté pour les graines *amiRNA1* T1. Afin de tester cette hypothèse une expérience d'apport exogène en carnitine à la concentration de 5 mM dans le milieu de culture M&S a été initiée. Une trentaine de graines *amiRNA1* T1 et Col-0 ont été semées sur du milieu M&S et M&S additionné de carnitine, puis leur germination a été suivie pendant 7 jours (**Figure 48**).

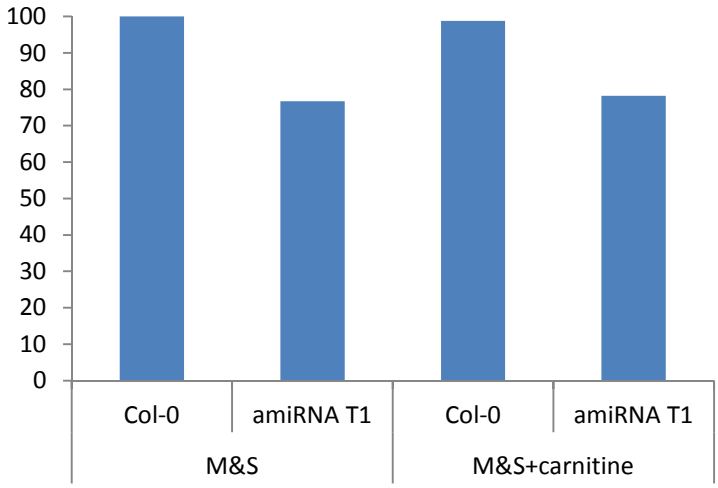


Figure 48: Pourcentage de germination des graines *amiRNA1* T1 et Col-0 sur du milieu M&S et M&S supplémenté en carnitine (5mM) après 7 jours de culture. Les résultats sont exprimés en pourcentage de graines germées par rapport au nombre total de graines semées.

Les résultats montrent que le taux de germination des graines *amiRNA1* T1 et Col-0 (76,7 % et 78,2 % respectivement) est similaire dans les deux milieux de culture. La carnitine exogène ne semble pas améliorer la germination des graines *amiRNA1* T1. Un apport exogène de γ-BB dans le milieu de culture n'a pas été testé car ce composé est toxique pour les plantules d'Arabidopsis (Charrier, 2009) et la quantité de graines disponibles n'a pas permis d'envisager de tester l'effet d'une gamme de concentrations.

- Suivi du développement post-germinatif des plantules *amiRNA1* T1

Le développement post-germinatif des plantules *amiRNA1* T1 a également été suivi pendant 14 jours (**Figure 49**).

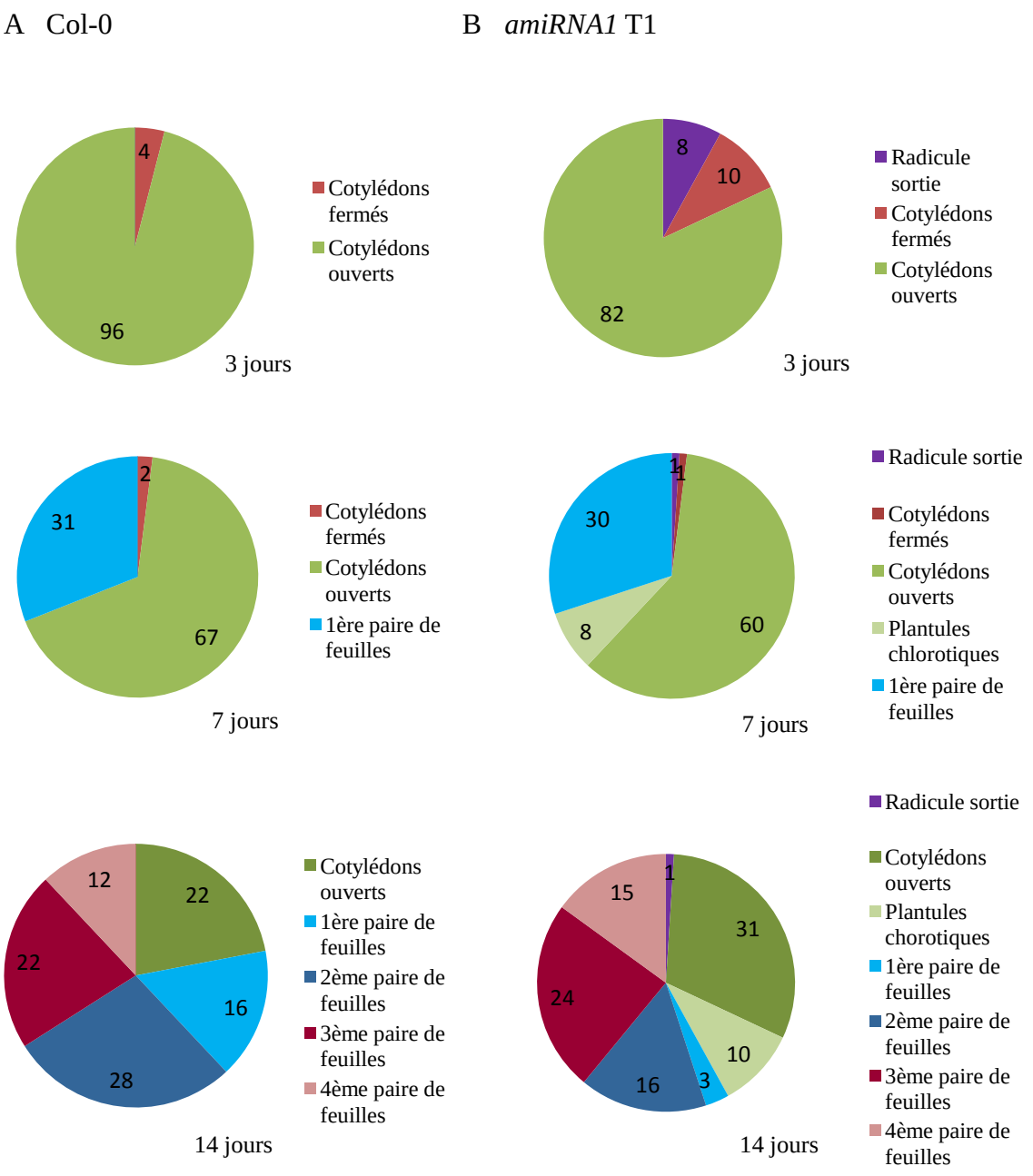


Figure 49: Etude du développement post-germinatif des plantules Col-0 (A) et *amiRNA1* T1 (B) (les résultats sont donnés en pourcentage de plantules par rapport aux graines germées).

Après 3 jours, 96 % des plantules Col-0 sont au stade cotylédons ouverts contre 82 % pour les plantules *amiRNA* T1. L'émergence de la radicule est terminée pour les graines Col-0 tandis que 8 % des graines sont encore à ce stade pour les germinations *amiRNA1* T1. Après une semaine, alors que 30 % des plantules sont au stade du développement de la première paire de feuilles dans les deux cas, 8 % des plantules *amiRNA1* T1 arrêtent leur développement au stade cotylédons ouverts et apparaissent chlorotiques. Ce taux atteint 10 % après deux semaines de

culture. A 14 jours, alors qu'une proportion identique de plantules atteint le stade troisième et quatrième paire de feuilles dans les deux populations, 31 % sont au stade cotylédons ouverts pour les plantules *amiRNA1* contre seulement 22 % pour les plantules sauvages. Ces différences sont significatives au regard de tests X^2 ($P < 0,01$).

Ainsi, alors que le développement des plantules Col-0 est homogène, 20 % des graines *amiRNA1* ne germent pas, 10 % des plantules arrêtent de se développer au stade de la radicule sortie ou au stade cotylédons ouverts et deviennent chlorotiques (**Figure 50**).

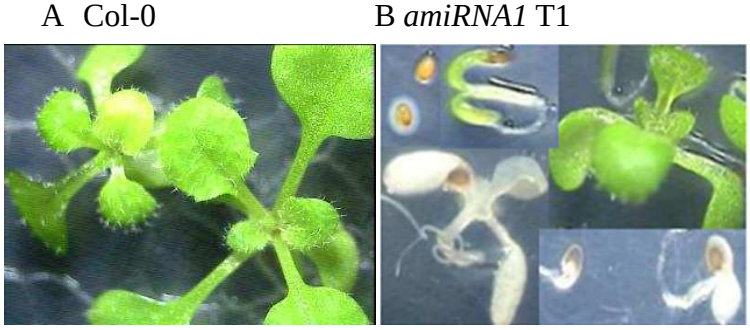


Figure 50: Phénotype des plantules Col-0 (A) et *amiRNA1* T1 (B) à 14 jours.

Afin de vérifier que l'effet observé sur le développement des plantules est lié à la construction utilisée, et non au procédé de transformation des plantes T0, le développement précoce de plantules T1 issues de graines non fluorescentes a également été comparé à celui de plantules Col-0. Les résultats montrent que le pourcentage de germination des graines (97 % pour les graines non fluorescentes et 98 % pour Col-0) et de plantules développées (80 % de plantules au stade cotylédons ouverts et 20 % au stade cotylédons fermés pour les graines non fluorescentes, contre 82 % et 18 % pour Col-0) est identique pour les deux populations de graines (**Figure 51**). Ceci confirme que le phénotype développemental observé est lié à l'*amiRNA1* .

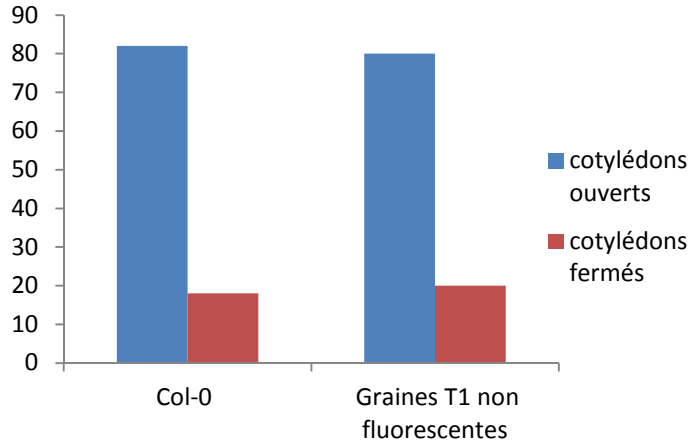


Figure 51: Stade de développement de plantules Col-0 et T1 issues de graines non fluorescentes provenant de la transformation par la construction *amiRNA1* après 3 jours de culture sur milieu M&S. Les résultats sont donnés en pourcentage de plantules par rapport au nombre total de plantules observées.

- Etude phénotypique des plantes *amiRNA1* T1

Les plantules *amiRNA1* T1 viables âgées de 15 jours et des plantules Col-0 ont été repiquées en terre et transférées en serre. Le diamètre des rosettes, celui des tiges, la hauteur de la tige principale et la longueur des siliques ont été mesurés sur chaque plante individuelle afin d'observer un effet éventuel de l'*amiRNA* sur le développement des plantes (**Tableau 22**).

Tableau 22: Etude des phénotypes visibles des plantes *amiRNA1* T1. Le diamètre des rosettes a été mesuré à 33 jours. A 46 jours celui des tiges (moyenne de 5 tiges), la longueur des siliques (moyenne de 10 siliques) et la hauteur de la tige principale ont également été mesurés.

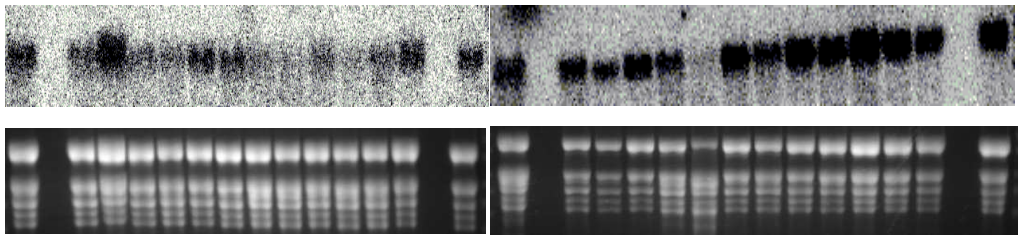
	Col-0	Col-0	A_1	B_1	C_1	D_1	E_1	F_1	G_1	H_1	I_1	J_1	K_1	L_1
Diamètre des tiges (mm)	1,75 +/- 0,29	1,63 +/- 0,48	1,13 +/- 0,48	1, 5 +/- 0,41	0,9 +/- 0,27	1,25 +/- 0,29	1 +/- 0,41	1,13 +/- 0,25	1,15 +/- 0,47	0,69 +/- 0,24	1,25 +/- 0,65	0,68 +/- 0,24	1,25 +/- 0,29	1,25 +/- 0,29
Longueur des siliques (cm)	1,7 +/- 0,23	1,78 +/- 0,13	1,62 +/- 0,15	1,58 +/- 0,16	1,78 +/- 0,11	1,64 +/- 0,17	1,7 +/- 0,07	1,54 +/- 0,09	1,44 +/- 0,17	1,46 +/- 0,11	1,76 +/- 0,09	1,62 +/- 0,13	1,72 +/- 0,16	1,56 +/- 0,13
Nombre de tiges	12	13	9	12	8	10	8	8	14	9	9	7	13	11
Hauteur de tige (cm)	55	62	38,5	48,5	19,5	50	43	59	55	41,5	49	36	55,5	47,5
Diamètre de rosette (cm)	4,4	5,6	4	4	3	3	2	4	4,2	2,6	4	2	4,2	4
	Col-0	**Col-0**	**M_1**	**N_1**	**O_1**	**P_1**	**Q_1**	**R_1**	**S_1**	**T_1**	**U_1**	**V_1**	**W_1**	**X_1**
Diamètre des tiges (mm)	1,75 +/- 0,29	1,63 +/- 0,48	0,63 +/- 0,25	1, 5 +/- 0,68	0,63 +/- 0,3	1,25 +/- 0,63	1,5 +/- 0,38	0,68 +/- 0,3	0,95 +/- 0,42	1,38 +/- 0,48	0,69 +/- 0,2	0,88 +/- 0,25	1,13 +/- 0,48	0,9 +/- 0,12
Longueur des siliques (cm)	1,7 +/- 0,23	1,78 +/- 0,13	1,58 +/- 0,16	1,56 +/- 0,05	1,6 +/- 0,4	1,8 +/- 0,12	1,8 +/- 0,1	1, 4 +/- 0,2	1,56 +/- 0,11	1,44 +/- 0,11	1,4 +/- 0,01	1,38 +/- 0, 3	1,76 +/- 0,25	1,56 +/- 0,11
Nombre de tiges	12	13	8	15	5	15	12	3	9	15	5	10	12	6
Hauteur de tige (cm)	55	62	36,5	54,5	43,5	55	66	27,5	47,5	58	31,5	35	57	40
Diamètre de rosette (cm)	4,4	5,6	4	4,6	3	5	3,6	2	3	4,2	2	4	4,4	3

Les résultats du **tableau 22** mettent en évidence des différences développementales mesurables pour une dizaine de plantes. Les plantes H, J, M, O, R et U ont un diamètre de tige réduit par rapport aux plantes Col-0. Parmi elles, les plantes H, J, R et U présentent également une taille réduite. Il est important de souligner que les plantes R et U n'ont développé des siliques que très tardivement (aucune silique après 37 jours, alors que des siliques matures étaient visibles sur toutes les autres plantes).

- Etude de l'expression du gène *ALDH10A9* dans les plantes *amiRNA1* T1

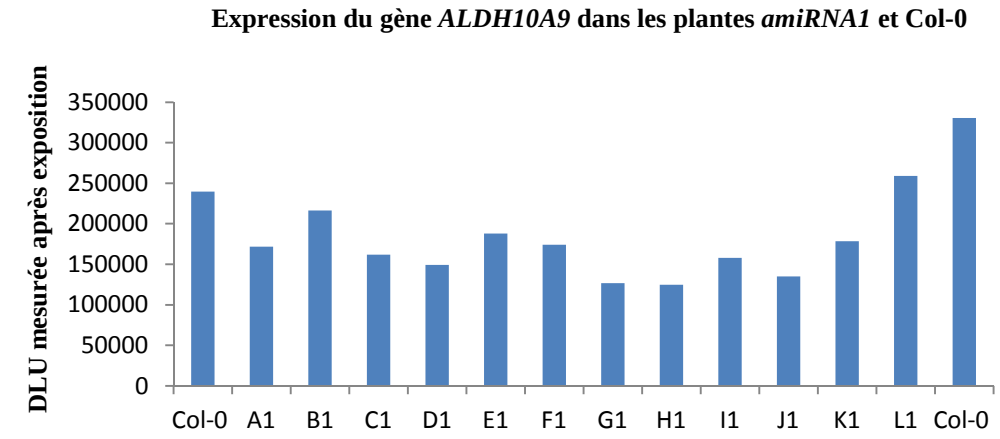
Afin d'étudier l'effet de l'expression de l'*amiRNA1* dans les plantes transgéniques de la génération T1 sur l'expression du gène *ALDH10A9,* des prélèvements de feuilles ont été effectués à 33 jours. Des Northern blots ont été réalisés à partir des ARN totaux extraits de ces feuilles à l'aide d'une sonde spécifique du gène *ALDH10A9* (**Figure 52**).

A



Col-0 A_1 B_1 C_1 D_1 E_1 F_1 G_1 H_1 I_1 J_1 K_1 L_1 Col-0 Col-0 M_1 N_1 O_1 P_1 Q_1 R_1 S_1 T_1 U_1 V_1 W_1 X_1 Col-0

B



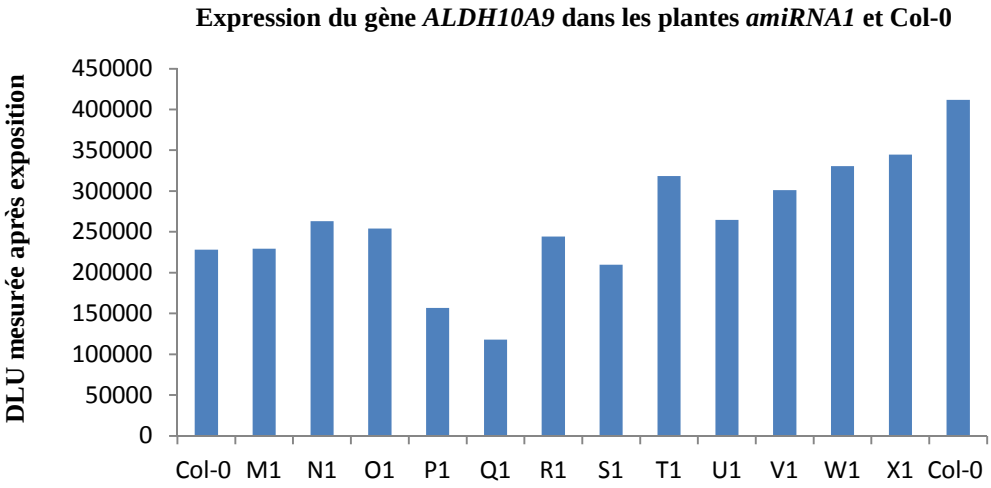


Figure 52: Expression du gène *ALDH10A9* dans les plantes *amiRNA1* T1.

A: Northerns blots et coloration au BET des ARN totaux sur gel dénaturant.

B: Quantification de l'expression des ARNm corrigée par rapport à l'intensité de l'ARNr 18S, témoin de chargement (DLU : digital light units).

Les résultats de la **figure 52** montrent que le gène *ALDH10A9* s'exprime différemment dans les plantes testées. Certaines, comme les plantes B_1, L_1, X_1 par exemple, n'apparaissent pas très affectées du point de vue de l'expression de ce gène, celle-ci étant comparable à celle obtenue chez les témoins Col-0. D'autres plantes, comme les plantes G_1, H_1, J_1, P_1, Q_1 présentent une expression plus réduite du gène mais qui n'est pas nécessairement corrélée à un phénotype développemental différent de Col-0 (**Tableau 22**). Il faut noter qu'aucune des plantes testées ne présente une expression nulle du gène *ALDH10A9*.

2.2.2.2 Construction *amiRNA2* génération T1

- Germination et développement des plantes *amiRNA2* T1

De manière comparable, des graines fluorescentes issues des plantes transformées avec la construction génétique permettant l'expression de l'*amiRNA2* ont été sélectionnées et mises en culture. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec la construction *amiRNA1* T1, avec les graines sauvages et les graines non fluorescentes issues des plantes T0 ayant subi le processus de transformation (**Tableau 23**). La construction *amiRNA2* affecte également le pouvoir germinatif des graines puisque 21,4 % des graines *amiRNA2* T1 ne germent pas et entraîne un arrêt de développement pour 40,2 % des graines.

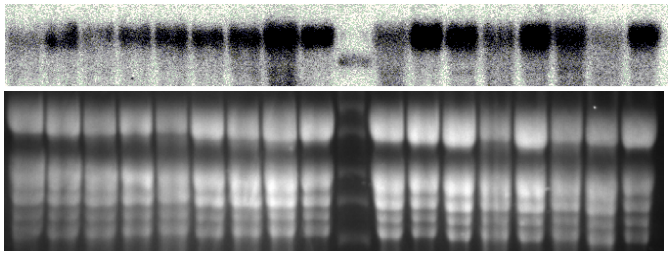
Tableau 23 : Effet des *amiRNA* sur la germination des graines et le développement des plantules T1. Les résultats sont donnés en pourcentage de graines totales.

Graines	Graines germées	Plantes développées	Plantes arrêtées
Col-0	98 %	98 %	0 %
Non fluorescentes	97 %	97 %	0 %
amiRNA1	80,2 %	37,9 %	42,3 %
amiRNA2	78,6 %	38,4 %	40,2 %

- Etude de l'expression du gène *ALDH10A9* dans les plantes *amiRNA2* T1

Un Northern blot a également été réalisé à partir d'ARN totaux extraits des feuilles de quinze plantes adultes *amiRNA2* T1 et de deux plantes sauvages (**Figure 53**).

A



Co1-0 A_2 B_2 C_2 D_2 E_2 F_2 G_2 H_2 M Col-0 I_2 J_2 K_2 L_2 M_2 N_2 O_2

B

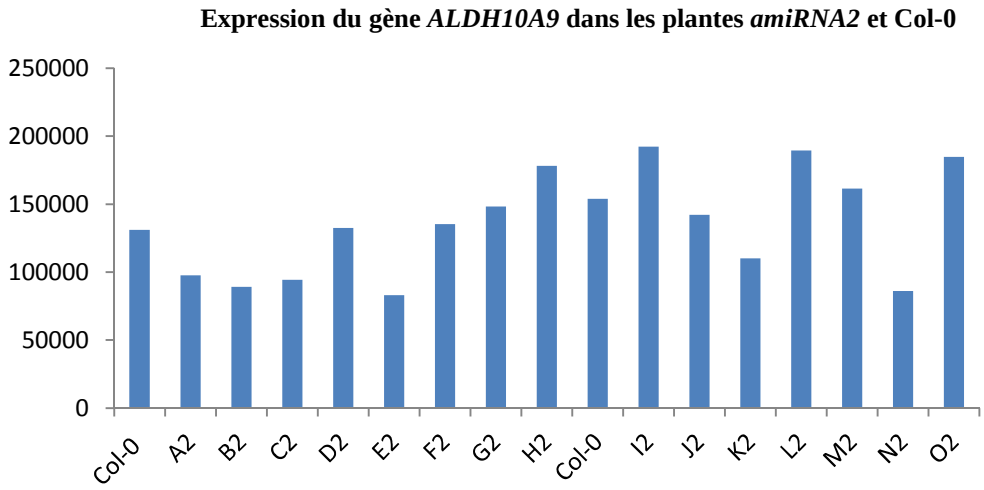


Figure 53: Expression du gène *ALDH10A9* dans les plantes *amiRNA2* T1.
A: Northerns blots et coloration au BET des ARN totaux sur gel dénaturant.
B: Quantification de l'expression des ARNm corrigée par rapport à l'intensité de l'ARNr 18S, témoin de chargement (DLU: digital light units).

Là encore, aucune plante dépourvue d'expression du gène *ALDH10A9* n'a été obtenue. Les plantes B_2, E_2, C_2 et N_2 ont une quantité de transcrits parmi les plus faibles.

L'étude phénotypique sur les plantes *amiRNA2* T1 a montré que les plantes E_2, K_2, N_2 et O_2, ont un diamètre de tige réduit par rapport aux plantes Col-0. Les plantes J_2, K_2, N_2 présentent une taille réduite.

2.2.2.3 Conclusion sur la génération T1

La transformation d'Arabidopsis par des constructions génétiques permettant l'expression de deux micro-ARN (*amiRNA1* et *amiRNA2*) a permis d'obtenir des plantes ayant une expression plus faible du gène *ALDH10A9* mais aucun mutant perte de fonction. Les deux

constructions ont un effet délétère sur la germination (20 % des graines fluorescentes ne germent pas) et le développement (seuls 38 % des graines fluorescentes se développent jusqu'à la plante adulte en serre). Des phénotypes mesurables sur les plantes adultes ne sont pas toujours corrélés avec une expression plus faible du gène *ALDH10A9*.

A l'issu des ces travaux les plantes *amiRNA1* C_1, H_1, J_1 et *amiRNA2* E_2, K_2, N_2 ont été choisies sur la base de critères phénotypiques plus ou moins marqués et d'expression du gène *ALDH10A9* plus ou moins réduite afin d'étudier l'effet de cette diminution de la quantité d'ARNm sur la biosynthèse de la carnitine.

2.2.2.4 Génération T2

- Etude de la germination et post germination des plantes *amiRNA1* et *amiRNA2* T2

Les graines T2 (deuxième génération) des plantes C_1, H_1, J_1 et E_2, K_2, N_2 ont été récoltées. Ces graines étant issues de plantes hétérozygotes pour les insertions qu'elles contiennent ont été observées en microscopie afin de vérifier le rapport du nombre de graines fluorescentes sur celui du nombre de graines non fluorescentes. Ce ratio est proche de 75 %, soit un quart de graines sauvages et trois quarts de graines transgéniques montrant l'existence d'un seul locus transgénique (ou des loci génétiquement liés).

Ainsi des graines fluorescentes T2 (12 à 18 graines) ont été sélectionnées et semées sur du milieu M&S et leur germination ainsi que le développement des plantules ont été suivis (**Figures 54, 55**).

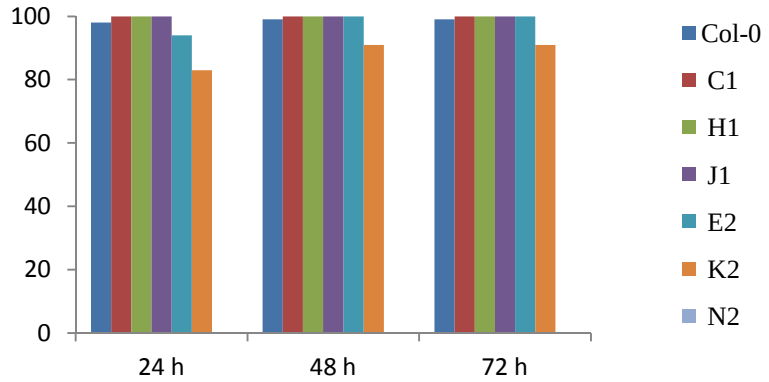
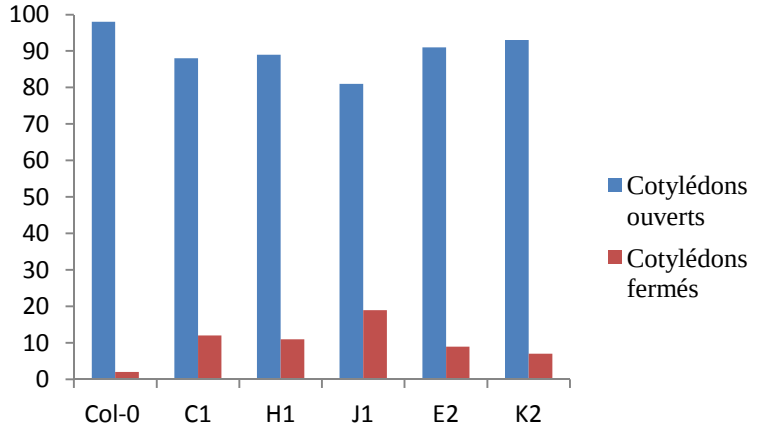


Figure 54: Pourcentage de germination des graines C_1, H_1, J_1 (*amiRNA1)*, E_2, K_2, N_2 (*amiRNA2)* T2 et Col-0. Les résultats sont exprimés en pourcentage de graines germées par rapport au nombre total de graines semées.

Parmi les six lots de graines fluorescentes testées (à l'état hétérozygote ou homozygote), les graines C_1, H_1, J_1 ne présentent pas de problème de germination. Par contre aucune graine N_2 ne germe, ainsi que 9 % des graines K_2 (contre 1 % seulement chez les Col-0). Pour toutes les lignées *amiRNA* un retard de développement apparait à partir de 3 jours qui s'accentue ensuite (**Figure 55**). Ainsi après 12 jours, seulement 20 à 53 % des plantules *amiRNA* sont au stade de la troisième paire de feuilles contre 75 % chez Col-0. De plus 24 à 35 % des plantules arrêtent de se développer. Ces résultats sont significatifs au regard d'un test X^2 ($P < 0,01$).

A: 3 jours



B: 12 jours

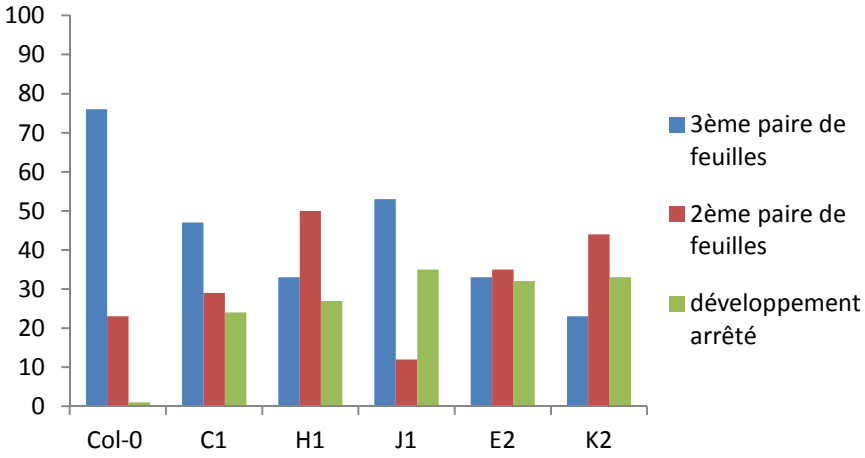


Figure 55: Etude du développement post-germinatif des plantules Col-0 et *amiRNA1* et *amiRNA2* T2 à 3 jours (A) et 12 jours (B) (les résultats sont donnés en pourcentage de plantules par rapport aux graines germées).

- Etude phénotypique des plantes *amiRNA1* et *amiRNA2* T2

Afin de vérifier si les différences phénotypiques notées sur la génération T1 sont conservées dans la génération T2, les plantules *amiRNA1* et *amiRNA2* T2 viables âgées de 15 jours et des plantules Col-0 ont été repiquées en terre et transférées en serre. Le diamètre des rosettes, celui des tiges, le nombre de tiges et la hauteur de la tige principale ont été mesurés sur des plantes de la génération T2 (**Tableau 24**).

Tableau 24: Etude des phénotypes visibles des plantes *amiRNA1* et *amiRNA2* T2. Le diamètre des rosettes a été mesuré à 33 jours. Le diamètre de tige, le nombre de tiges et la hauteur de la tige principale ont été mesurés à 46 jours. Ces mesures ont été faites sur 5 à 12 plantes.

	Col-0	C_1	H_1	J_1	E_2	K_2
Diamètre de la tige (mm)	1,18 +/- 0,12	1,05 +/- 0,15	1,09 +/- 0,15	0,81 +/- 0,16	1,10 +/- 0,15	0,94 +/- 0,18
Nombre de tiges	13,83 +/- 1,89	15,45 +/- 4,41	13,91 +/- 3,92	13,57 +/- 1,63	18,64 +/- 3,97	16 +/- 4,77
Hauteur de tige (cm)	46,58 +/- 4,75	44,68 +/- 5,29	41,23 +/- 5,70	45,07 +/- 2,47	53,71 +/- 5,07	45,46 +/- 6,41
Diamètre des rosettes (cm)	5,5 +/- 0,97	4,13 +/- 1,01	3,66 +/- 0,70	3,63 +/- 0,88	4,13 +/- 1,35	3,29 +/- 0,93

La deuxième génération de plantes J_1 a un diamètre de tige et de rosette plus faibles que les plantes sauvages. Les plantes H_1, J_1 et K_2 ont un diamètre de rosette plus petit que les plantes Col-0 (**Tableau 24**). Les phénotypes mesurables mis en évidence sur la première génération de plantes semblent moins nets sur la deuxième génération, ainsi par exemple le nombre de tiges et la hauteur de tiges semblaient affectés chez la plante mère J_1 (**Tableau 22**). Il faut noter cependant que pour la première génération les mesures ont été faites sur une seule plante.

A l'issu des ces travaux les plantes T2 homozygotes pour les *amiRNA1* J_1 et *amiRNA2* K_2 ont été choisies sur le critère de la fluorescence des graines (une plante homozygote donnant 100 % de graines fluorescentes) afin d'étudier l'effet des *amiRNA1* et *amiRNA2* ciblant le gène *ALDH10A9* sur la biosynthèse de la carnitine dans la génération T3.

2.2.2.5 Génération T3

- Etude de la germination et post germination des plantes *amiRNA1* et *amiRNA2* T3

Les graines T3 des plantes J_1 et K_2 ont été semées sur du milieu M&S. Aucune différence du taux de germination n'a été constaté entre les graines transgéniques et les graines sauvages qui avoisinaient tous deux les 99 %. De même un suivi du développement des plantules jusqu'à 12 jours ne montre qu'un très faible retard de développement (**Figure 56**).

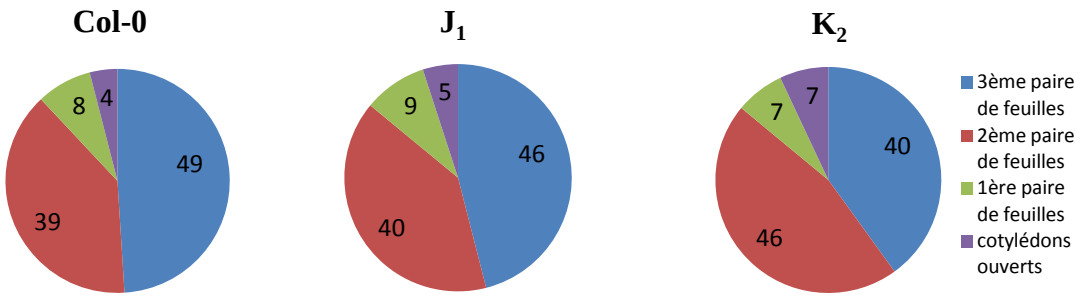


Figure 56: Stade de développement des plantules de la génération T3 à 12 jours. Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre de plantules.

- Etude phénotypique des plantes *amiRNA1*et *amiRNA2* T3

Les plantules *amiRNA1* et *amiRNA2* T3 âgées de 15 jours et des plantules Col-0 ont été repiquées en terre et transférées en serre. Le diamètre des rosettes, celui des tiges, le nombre de tiges et la hauteur de la tige principale ont été mesurés sur 10 plantes de chaque phénotype (**Tableau 25**). Aucune différence phénotypique mesurable n'a été constatée

	Col-0	J_1	K_2
Diamètre de la tige (mm)	1,05 +/- 0,10	1,01 +/- 0,11	1,08 +/- 0,06
Nombre de tiges	13,14 +/- 2,34	13,5 +/- 2,84	12,4 +/- 2,22
Hauteur des tiges (cm)	47,28 +/- 5,98	49,45 +/- 4,91	47,33 +/- 4,50
Diamètre des rosettes (cm)	5,07 +/- 0,62	4,46 +/- 1,02	4,61 +/- 1,26

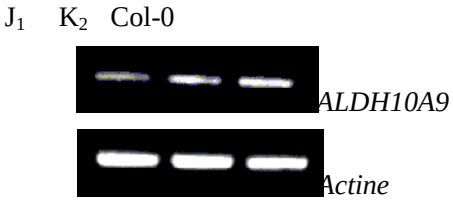
Tableau 25: Etude des phénotypes visibles des plantes *amiRNA1* et *amiRNA2* T3. Le diamètre des rosettes a été mesuré à 33 jours. Le diamètre des tiges, le nombre de tiges et la hauteur de la

tige principale ont été mesurés à 46 jours.

- Etude de l'expression du gène *ALDH10A9* chez les lignées J_1 et K_2

Afin de vérifier l'effet des deux constructions d'*amiRNA* utilisées à la génération T3, des graines des deux lignées J_1 et K_2 ont été semées sur du milieu M&S et les ARN ont été extraits après 3 jours. Des expériences de RT-PCR semi-quantitative (A) et quantitative (B) ont été réalisées (**Figure 57**).

A



B

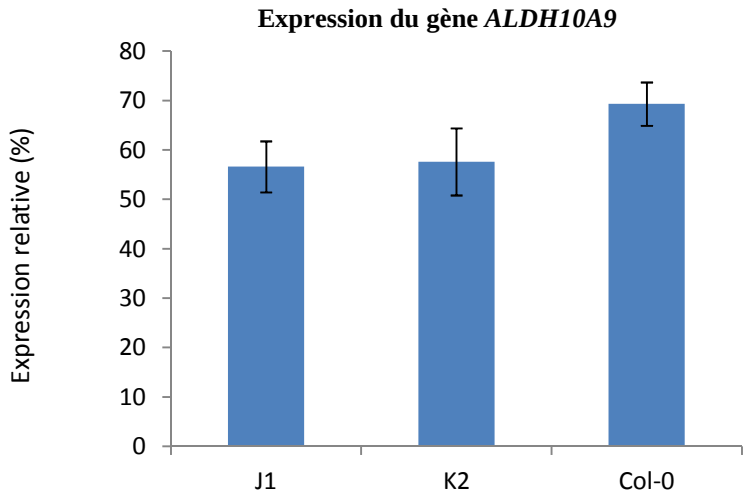


Figure 57: Analyse de l'expression du gène *ALDH10A9* chez les lignées J_1 et K_2 à la génération T3. Les écart-types indiqués ont été obtenus à partir de trois répétitions techniques.
A: RT-PCR semi-quantitative réalisée à l'aide des amorces AF370333_RT_fwd, AF370333_RT_rev (gène ALDH10A9) et SR68, SR69 (gène actine) après 25 cycles de RT-PCR.
B: RT-PCR quantitative réalisée à l'aide des amorces 10A9-Fwd et 10A9-Rev.

Les résultats confirment une baisse de l'expression du gène *ALDH10A9* dans les deux lignées transformées avec une construction permettant l'expression de l'*amiRNA1* ou *amiRNA2*

d'environ 20 % (ces résultats ont été confirmés au cours d'une répétition biologique indépendante).

Les lignées obtenues, présentant une diminution de transcription du gène *ALDH10A9* sont donc des mutants Knock-Down. Par simplification, la lignée J_1 transformée par l'*amiRNA1*, est renommée *KD9-1* et la lignée K_2, transformée par l'*amiRNA2*, est renommée *KD9-2*.

- Analyse de la teneur en γ-BB sur les plantules *KD9-1* et *KD9-2*

Afin d'étudier l'effet d'une diminution de l'expression du gène *ALDH10A9* sur la synthèse de carnitine chez *A. thaliana*, des extraits de plantules *KD9-1* et *KD9-2* ont été analysés par LC-ESI-MS/MS. Dans la mesure où des retards de développement avaient été mis en évidence à partir de 72 h pour la génération de plantules T2 des lignées transgéniques, les analyses concernant les plantules T3 ont été faites sur du matériel de 48 h afin d'avoir des populations de plantules les plus synchrones possibles entre la lignée sauvage et les lignées mutantes.

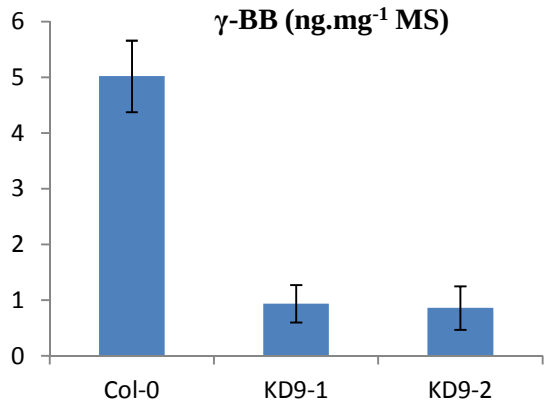


Figure 58: Teneur en γ-BB dans des extraits de plantules de 48 h d'*A. thaliana* Col-0 et plantules T3 *KD9-1* et *KD9-2*. (MS: matière sèche). Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions biologiques indépendantes.

Les résultats (**Figure 58**) indiquent que la teneur moyenne en γ-BB dans les extraits de plantules *KD9-1* et *KD9-2* est réduite d'environ 82 % par rapport à des plantules sauvages. En effet les plantules *KD9-1* exprimant l'*amiRNA1* et *KD9-2* exprimant l'*amiRNA2* contiennent en moyenne 0,939 ± 0,334 $ng.mg^{-1}$ MS et 0,862 ± 0,389 $ng.mg^{-1}$ MS de γ-BB respectivement, contre 5,018 ± 0,641 $ng.mg^{-1}$ MS pour les plantules Col-0.

- Analyse de la teneur en carnitine sur les plantules *KD9-1* et *KD9-2*

Ces mêmes extraits végétaux ont été analysés d'un point de vue de la teneur en carnitine libre. Elle est de 0,330 ± 0,099 et 0,306 ± 0,059 ng.mg^{-1} MS dans des plantules *KD9-1* et *KD9-2* de 48 h contre 1,172 ± 0,285 ng.mg^{-1} MS chez Col-0, soit une réduction de 72 et 74 % chez les mutants (**Figure 59**).

En parallèle, une saponification a été faite sur des extraits végétaux de plantules *KD9-1*, *KD9-2* et Col-0 de 48 h cultivées dans les mêmes conditions afin de libérer la fraction de carnitine estérifiée (**Figure 59**).

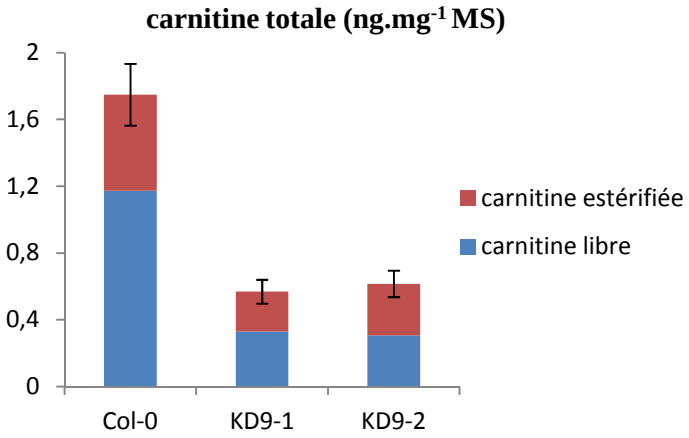


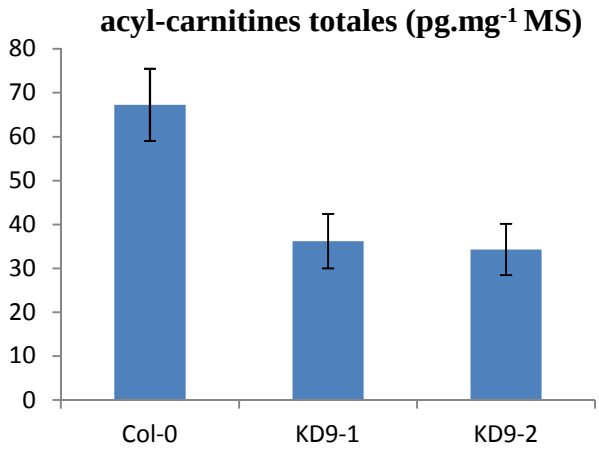
Figure 59: Teneur en carnitine libre et estérifiée dans des extraits de plantules d'*A. thaliana KD9-1* et *KD9-2* de 48 h cultivées sur milieu M&S (MS: matière sèche). Les résultats représentent la moyenne de trois répétitions biologiques indépendantes (± l'écart-type).

La teneur en carnitine totale est diminuée environ de 2,5 fois dans des extraits de plantules *KD9-1* et *KD9-2* par rapport à des extraits de plantules sauvages. En effet elle n'est que de 0,569 ± 0,071 et 0,615 ± 0,079 ng.mg^{-1} MS chez les mutants contre 1,747 ± 0,185 ng.mg^{-1} MS chez Col-0, soit 67,4 % et 64,7 % de carnitine en moins. De la même manière, la carnitine estérifiée est réduite de 58,4 % et 46,2 % chez les mutants (0,239 ± 0,061 et 0,309 ± 0,098 ng.mg^{-1} MS de carnitine estérifiée contre 0,575 ± 0,127 ng.mg^{-1} MS chez Col-0).

- Analyse de la teneur en acyl-carnitines

Une quantification de la teneur en différentes acyl-carnitines de longueur de chaine carbonée variable a également été réalisée sur des extraits végétaux obtenus à partir de plantules de 48 h chez Col-0 et les mutants *KD9-1*, *KD9-2* par LC-ESI-MS/MS (**Figure 60**).

A



B

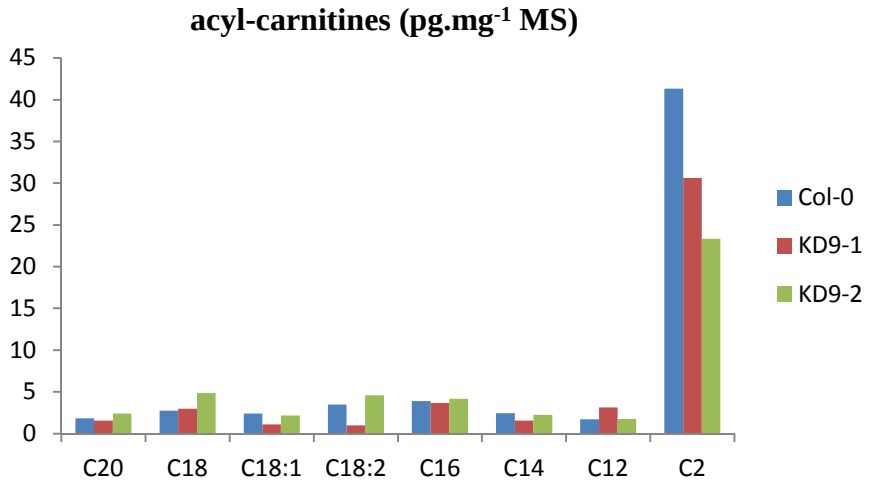


Figure 60: Teneurs en acyl-carnitines de plantules d'*A. thaliana* Col-0, *KD9-1* et *KD9-2* de 48 h cultivées sur milieu M&S (MS: Matière Sèche). A: Teneur totale en acyl-carnitines, les résultats représentent la moyenne de trois répétitions biologiques indépendantes (± l'écart-type). B: Teneur en différentes acyl-carnitines d'un extrait (C20: arachidoyl-canitine, C18: stéaroyl-carnitine, C18:1: oléoyl-carnitine, C18:2: linoléoyl-carnitine, C16: palmitoyl-carnitine, C14: myristoyl-carnitine, C12: lauroyl-carnitine, C2: acétyl-carnitine).

Des extraits de plantules *KD9-1*, *KD9-2* de 48 h contiennent environ 1,9 fois moins d'acyl-carnitine que des extraits obtenus à partir de plantules sauvages (36,1 et 34,2 pg.mg^{-1} MS contre 67,2 pg.mg^{-1} MS) soit une diminution de 48 % en moyenne (**Figure 60, A**). Parmi les molécules quantifiées, la diminution est retrouvée surtout pour l'acétyl-carnitine, très majoritaire dans ces analyses. Les acyl-carnitines libérées par saponification représentent 15 %

et 11 % de la carnitine estérifiée chez les mutants *KD9-1*, *KD9-2* et 12 % chez le sauvage Col-0, soit une proportion équivalente (**Figure 60, B**).

2.2.2.6 Conclusion

Une approche de mutagénèse par expression de micro-ARN artificiels *amiRNA1* et *amiRNA2* a permis d'obtenir deux lignées *KD9-1* et *KD9-2* présentant une diminution de l'expression du gène *ALDH10A9* d'environ 20 %, une baisse de la teneur en γ-BB de 82 % et de la carnitine totale de 65 % environ. Aucune lignée perte de l'expression du gène *ALDH10A9* n'a été obtenue. Bien que des phénotypes développementaux aient été mis en évidence dans les deux premières générations de plantes transgéniques, les plantes de troisième génération semblent se développer de manière comparable aux plantes sauvages dans nos conditions.

3. Discussion et perspectives

Chez les animaux et la levure *C. albicans* une enzyme TMABADH est en charge de la conversion de TMABA en γ-BB, qui est le précurseur de la carnitine. Chez Arabidopsis les enzymes ALDH2 et ALDH10 sont des candidats possibles pour permettre la synthèse de cette molécule. Bien que les enzymes ALDH2 soient proposées pour être impliquées dans le contournement de la pyruvate déshydrogénase consistant en l'oxydation d'acétaldéhyde en acétate pour la biosynthèse d'acétyl-CoA (Wei *et al*., 2009), nous avons analysés les mutants perte de fonction *aldh2B4-1*, *aldh2B4-2*, *aldh2B7-1*, *aldh2C4-1*, *aldh2C4-2* compte tenu des homologies de séquence entre les protéines de mammifère, de levure et de plante. Nos données n'ont pas mis en évidence de diminution de la teneur en carnitine chez ces mutants. Les protéines ALDH2 ne semblent donc pas être impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine.

Les protéines ALDH10A8 et ALDH10A9 sont de bons candidats pour catalyser la réaction de synthèse de la γ-BB chez Arabidopsis. En effet les séquences de ces protéines sont identiques à plus de 70 % aux protéines de pois PsAMADH1 et PsAMADH2 oxydant le TMABA en γ-BB *in vitro* (Tylichova *et al*., 2010; Rippa *et al*., 2012). Nos analyses ont permis de montrer que le mutant *KO8-2*, perte de fonction du gène *ALDH10A8*, a une teneur réduite en γ-BB de 61 %. Des lignées *KD9-1* et *KD9-2*, exprimant des *amiRNA* contre le gène *ALDH10A9*, bien que peu affectées au niveau de l'expression du gène *ALDH10A9* (20 % en moins) ont une teneur en γ-BB également réduite de 82 % par rapport aux plantes sauvages. Il semble donc que les deux enzymes ALDH10A8 et ALDH10A9 soient impliquées dans la synthèse de γ-BB, précurseur de la carnitine chez Arabidopsis.

Les analyses de teneur en carnitine sur les mutants *KO8-2*, *KD9-1* et *KD9-2* confirment nos hypothèses sur la similitude qui existe entre les voies de biosynthèse de la carnitine animale, de levure et de plante. En effet une réduction de la teneur en γ-BB chez ces mutants est également accompagnée d'une diminution de la teneur en carnitine du même ordre. Ainsi la réduction de γ-BB chez *KO8-2* se traduit par une diminution de la carnitine totale de 57 % et celle mesurée chez *KD9-1*et *KD9-2* se traduit par une diminution d'environ 65 % de la carnitine totale par rapport à des extraits de plantules Col-0. Donc bien que nos analyses bioinformatiques n'aient pas mis en évidence de protéine d'Arabidopsis candidate pour être une butyrobétaine dioxygénase en charge de la conversion de γ-BB en carnitine, nos données montrent que la γ-BB est certainement le précurseur de la carnitine chez Arabidopsis. Une analyse fonctionnelle est cependant nécessaire pour confirmer la capacité des enzymes ALDH10A8 et ALDH10A9 à prendre en charge le substrat TMABA. Dans la mesure où il existe un mutant de levure *C. albicans* perte de fonction de l'enzyme TMABADH, une complémentation fonctionnelle peut être envisagée avec les gènes de plante (Strijbis *et al*., 2009).

Il a été montré récemment qu'un résidu isoleucine en position 444 de la séquence des ALDH10 d'Arabidopsis (suivant la numérotation des acides aminés de la séquence des PsAMADH) leur confère une activité BADH négligeable, c'est-à-dire une faible capacité à prendre en charge le substrat BAL (bétaïne aldhéhyde) ce qui va dans le sens d'une non implication des enzymes d'Arabidopsis dans la synthèse de GB (Kopecny *et al*., 2013). Nos analyses de la teneur en GB sur le mutant *KO8-2* confirment cette donnée. Des mesures similaires devront être réalisées sur les mutants *KD9-1* et *KD9-2*.

Il faut noter qu'une réduction de la transcription du gène *ALDH10A9* semble plus impactante sur la teneur en γ-BB qu'une perte de fonction du gène *ALDH10A8*. Ainsi une absence d'expression de ce dernier s'accompagne d'une diminution de la teneur en γ-BB de 61 %, tandis qu'une réduction de l'expression du gène *ALDH10A9* de seulement 20 % est accompagnée d'une diminution de la teneur en γ-BB de 82 %. Ceci peut s'expliquer par une différence de taux de traduction des deux transcrits (si la traduction de l'ARNm *ALDH10A9* est plus faible, une faible diminution de transcrit a un impact plus important sur la quantité d'enzyme synthétisée) ou bien par une différence d'activité entre les deux enzymes. Ainsi l'activité de la protéine PsAMADH1 avec le TMABA est légèrement meilleure que celle de la protéine PsAMADH2 (Tylichova *et al.*, 2009). Il est possible également, dans la mesure où les deux protéines n'ont pas la même localisation subcellulaire, ALDH10A8 étant localisée dans le leucoplaste et ALDH10A9 dans le péroxysome (Missihoun *et al.*, 2011), que la disponibilité du substrat pour les deux enzymes soit différente dans les deux compartiments.

Nos analyses montrent qu'une réduction de la teneur en carnitine totale chez les mutants

des ALDH10 est accompagnée d'une diminution de la teneur en carnitine estérifiée et notamment en acyl-carnitines. Ainsi une diminution de la teneur en carnitine totale de 57 % chez *KO8-2* est accompagnée d'une diminution de la teneur en carnitine estérifiée de 63 % et de la teneur en acyl-carnitines de 56 %. De même la diminution de 67,4 % ou 64,7 % de la teneur en carnitine totale chez *KD9-1* et *KD9-2* est accompagnée d'une diminution de la teneur en carnitine estérifiée de 58,4 % et 46,2 % et d'acyl-carnitines de 48 %. Ainsi malgré le fait que les acyl-carnitines que nous quantifions dans nos analyses ne représentent que 5 à 12 % de la carnitine estérifiée, cette fraction est impactée de la même manière que les autres formes de carnitine (libre ou estérifiée). Le pool de carnitine, qu'il soit lié ou non à un AG, semble affecté de la même manière par une mutation des ALDH10. Le rôle métabolique de la carnitine impliquant une estérification aux AG ne semble pas privilégié d'après ces données par rapport aux autres fonctions éventuelles de la carnitine. Il est possible également que la teneur en carnitine chez les mutants soit suffisante pour assurer la prise en charge des AG.

Il semble que la mutation perte de fonction du gène *ALDH10A9* soit létale pour le développement d'Arabidopsis. En effet il n'y a à ce jour aucune lignée perte de fonction de ce gène disponible dans les banques et l'approche de mutagenèse par expression de micro-ARN artificiels que nous avons initiée n'a pas permis d'isoler un tel mutant. D'ailleurs lors de la sélection des plantes transgéniques T1 issues de la transformation par les deux constructions devant permettre l'expression des *amiRNA1* et *amiRNA2*, 20 % de graines transgéniques se sont avérées incapables de germer et environ 40 % des plantules ont été incapables de se développer alors que les graines et les plantules de *KO8-2* ne sont pas affectées par la perte de fonction du gène *ALDH10A8*. Aussi, bien que les deux séquences des protéines ALDH10A8 et ALDH10A9 soient identiques entre elles à 80 % elles ne sont pas équivalentes d'un point de vue fonctionnel. Ceci est sans doute à rapprocher de la localisation différente des deux enzymes et de leur fonction cellulaire, nos données montrant une importance supérieure de la protéine ALDH10 péroxysomale pour la viabilité des plantes.

Bien que des phénotypes mesurables aient pu être mis en évidence à la génération T1 de plantes transformées avec la construction permettant l'expression des *amiRNA1* et *amiRNA2*, ils n'ont pas été confirmés à la génération T2 et les plantes T3 se sont avérées être tout à fait comparables aux plantes sauvages. Ces phénotypes n'étaient pas corrélés nécessairement avec le niveau d'expression du gène *ALDH10A9* et étaient peut-être liés à des différences de développement individuel des plantes. D'autre part à la génération T2, parmi les six lignées choisies seule la descendance de la plante N_2, s'est avérée incapable de germer ainsi que 9 % des graines K_2. Des retards de développement ont également été mis en évidence et 24 à 35 % des plantules ont arrêté leur développement pour les cinq lignées testées. A la génération T3 aucun problème de germination ou développement n'a été montré pour les graines

homozygotes J_1 et K_2. Cette perte de phénotype développemental à la génération T3 n'est pas liée à une perte d'effet des *amiRNA* sur l'expression du gène *ALDH10A9* dans la mesure où les analyses par RT-PCR quantitative ont montré une baisse d'expression de 20 %. Dans la mesure où les teneurs en γ-BB et carnitines n'ont été quantifiées qu'à la génération T3, il n'est pas possible de savoir si les baisses mesurées ont été compensées au cours des générations. La protéine ALDH10A8 pourrait ainsi compenser, la baisse d'activité de la protéine ALDH10A9 liée à la diminution de transcrits traduits chez les mutants *KD9-1* et *KD9-2* par une surexpression du gène *ALDH10A8* par exemple. Ceci pourra être vérifié par des expériences de RT-PCR quantitatives.

Dans la mesure où les protéines ALDH10A8 et ALDH10A9 sont très proches d'un point de vue de leur séquence en acide aminé, nous avions initialement transformé des plantes *KO8-2* indépendamment avec les deux constructions permettant l'expression des *amiRNA1* et *amiRNA2* suivant l'objectif d'obtenir un double mutant. Une quarantaine de graines fluorescentes ont été semées pour chaque construction sur du milieu M&S et seules 27 % de ces graines ont donné des plantes adultes (contre 38 % lors d'une transformation de Col-0, **Tableau 23**). Parmi les plantes obtenues un quart présentaient des phénotypes développementaux marqués (similaires à la plante U_1, **Tableau 22**) et ont donné peu de graines (0,3 à 10 % de graines par rapport aux plantes Col-0) montrant un effet plus important de la double mutation. De la même manière que pour les graines *amiRNA1* T1, nous avons semé des graines T1 *amiRNA1* de génotype *KO8-2* sur un milieu supplémenté en carnitine sans amélioration du taux de germination. Au terme de ces expérimentations il nous a semblé plus pertinent de choisir des lignées présentant une expression réduite du gène *ALDH10A9* en ayant la confirmation d'un phénotype sur la teneur en carnitine afin de les croiser avec le mutant *KO8-2* pour étudier l'effet d'une mutation des deux ALDH10. Les lignées *KD9-1* et *KD9-2* ayant été obtenues seront donc croisées à *KO8-2*.

Les deux gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* sont faiblement inductibles par le stress salin et le mutant *KO8-2* est plus sensible au stress salin et à la déshydratation que des plantes sauvages (Missihoun *et al*., 2011). Or nous avons montré récemment que la carnitine a un effet favorable sur le développement de plantules d'Arabidopsis en conditions de stress salin (Charrier *et al*., 2012). Donc bien que les enzymes ALDH10 soient proposées comme ayant un rôle de détoxification des aldéhydes produits en conditions de stress salin (Missihoun *et al*., 2011), il est possible que le phénotype observé chez *KO8-2* soit lié à la diminution de sa teneur en carnitine. Une observation du développement de plantules *KO8-2* en condition de stress salin sur un milieu supplémenté en carnitine permettra de vérifier cette hypothèse. Il sera également nécessaire de tester la sensibilité au stress salin des lignées *KD9-1* et *KD9-2*.

Les mutants *KO8-2*, *KD9-1* et *KD9-2* présentant des teneurs réduites en carnitine sont désormais un outil disponible pour étudier le rôle de cet acide aminé chez les plantes.

Chapitre VI – ETUDES PRELIMINAIRES DE LA FONCTION DES GENES *ALDH10A8* ET *ALDH10A9* CHEZ ARABIDOPSIS

La réduction de la teneur en γ-BB et en carnitine mesurée chez le mutant *KO8-2,* perte de fonction du gène *ALDH10A8,* et chez les mutants faibles *KD9-1* et *KD9-2* ayant une expression réduite du gène *ALDH10A9,* montre une implication probable des protéines ALDH10A8 et ALDH10A9 d'Arabidopsis dans la voie de biosynthèse de la carnitine. Ceci est certainement lié à la capacité des deux enzymes de convertir la TMABA en γ-BB et donc à être des TMABADH probable chez Arabidopsis. Néanmoins cela reste à démontrer. Un mutant de la levure *C. albicans* perte de fonction de la TMABADH a été isolé par l'équipe de B. Distel (Strijbis *et al*., 2009). Nous avons pu disposer de ce mutant pour tester la capacité des enzymes de la famille 10 des ALDH d'Arabidopsis à complémenter d'un point de vue fonctionnel cette mutation.

La localisation subcellulaire des deux protéines est différente chez la plante. En effet, la protéine ALDH10A8 est localisée dans le leucoplaste tandis que la protéine ALDH10A9 est située dans le peroxisome (Missihoun *et al.,* 2011). De plus la perte de fonction de ALDH10A9 semble létale tandis que la perte de fonction d'ALDH10A8 n'entraine pas de phénotype développemental notable dans les conditions normales de culture. Il est possible que cette différence fonctionnelle soit liée à la différence de localisation des protéines et/ou à une différence de l'expression spatio-temporelle des deux gènes. L'acquisition de données sur l'expression des deux gènes s'est donc avérée indispensable. D'autre part les deux protéines végétales sont identiques à 80 % d'un point de vue de leur séquence. Il est possible qu'elles aient un effet compensateur plus ou moins important lors de la perte ou baisse de l'activité de l'une d'elle. Aussi une analyse de l'expression de chacun des gènes chez chacune des lignées mutantes (*KO8-2, KD9-1* et *2*) a été réalisée.

1. Etude de la capacité de complémentation d'un mutant de levure par les enzymes ALDH10A8 et ALDH10A9

Les protéines ALDH10A8 et ALDH10A9 d'Arabidopsis sont identiques à 42 % à la protéine TMABADH de *C. albicans*. Afin de vérifier si cette homologie séquentielle correspond également à une homologie fonctionnelle, les séquences codantes des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* ont été isolées et utilisées pour construire des vecteurs plasmidiques devant permettre leur expression dans la levure afin de tester leur capacité à restaurer la croissance du mutant de *C. albicans tmabadh*Δ/Δ perte de fonction de la TMABADH (Strijbis *et al*., 2009). Ce mutant est incapable de se développer sur un milieu ne contenant que des AG comme source de carbone puisque leur voie de dégradation est totalement dépendante de la carnitine chez *Candida* (Strijbis *et al.*, 2008). Ainsi, des enzymes capables de convertir la

TMABA en γ-BB doivent restaurer la synthèse de la carnitine et donc indirectement le catabolisme des AG.

1.1 Préparation des clones de levure

Les séquences codantes des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* ont été amplifiées par RT-PCR à l'aide des primers ZY023, ZY024 et ZY013, ZY014 respectivement, à partir d'ARN totaux de plantules d'Arabidopsis Col-0 de 3 jours. Ces amorces PCR contiennent des séquences permettant l'introduction des sites de restriction BglII et KpnI de part et d'autre de la séquence amplifiée. Les gènes de plante ont ensuite été clonés dans le vecteur pGEM®-T Easy et vérifiés par séquençage. De la même manière le promoteur et le terminateur du gène *TMABADH* de levure ont été clonés indépendamment dans le vecteur pGEM®-T Easy après amplification par PCR à partir du plasmide pJB148 à l'aide des amorces ZY009, ZY010 et ZY015, ZY016 respectivement, introduisant les sites de restriction BamH1, BglII de part et d'autre du promoteur et KpnI et SacI de part et d'autre du terminateur. Puis les gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* ont été isolés à l'aide des enzymes BglII et SalI et clonés indépendamment dans le vecteur contenant le promoteur, ouvert par ces mêmes enzymes. Les fragments contenant le promoteur de levure et un gène de plante ont ensuite été isolés par les enzymes BamHI et KpnI puis clonés avec le fragment de terminateur isolé par les enzymes KpnI et SacI de manière concomitante dans le vecteur pLUBP ouvert par les enzymes BamHI et SacI. L'isolement du promoteur *TMABADH* fusionné à *ALDH10A9* a nécessité une digestion partielle dans la mesure où la séquence d'*ALDH10A9* contient un site SacI endogène. Ainsi deux plasmides pLUBP permettant l'expression des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* sous le contrôle du promoteur et du terminateur du gène *TMABADH* de levure, nommés pLUBP-*ALDH10A8* et pLUBP-*ALDH10A9,* ont été construits et ont été utilisés pour transformer la souche de *C. albicans tmabadh*Δ/Δ. Le plasmide pLUBP permet l'expression du gène *URA,* la sélection des clones positifs s'est donc faite par une croissance des levures sur un milieu de culture YNB avec 2 % glucose sans apport d'uracile.

Afin de vérifier les clones obtenus sur milieu sélectif, une amplification par PCR a été réalisée à l'aide des amorces ZY016 et AY093071_RT_fwd pour *ALDH10A8* et SR116 et SR119 pour *ALDH10A9* sur les clones obtenus. Les mêmes PCR sur les vecteurs pLUBP-*ALDH10A8* ou pLUBP-*ALDH10A9* ont été utilisés comme contrôle positifs. Des amplicons de 723 et 529 pb correspondant bien au produit d'amplification attendus ont été obtenus pour les clones *tmabadh*Δ/Δ Ura$^-$ transformés avec le vecteur pLUBP-*ALDH10A8* et pLUBP-*ALDH10A9* (**Figure 61**). Ces clones de levure ont été nommés *tmabadh*Δ/Δ+*ALDH10A8* et *tmabadh*Δ/Δ+ *ALDH10A9.*

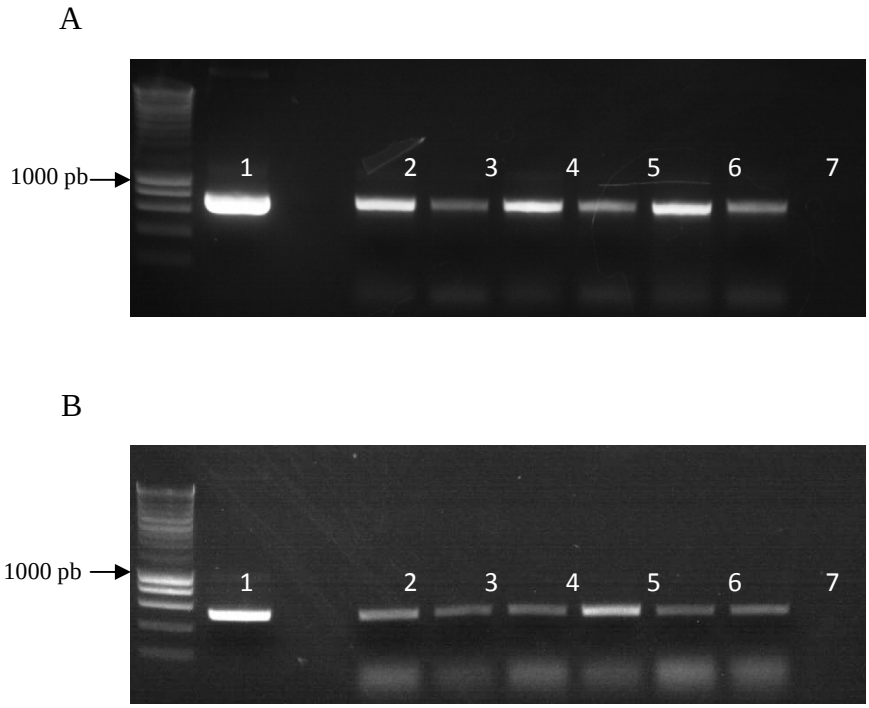


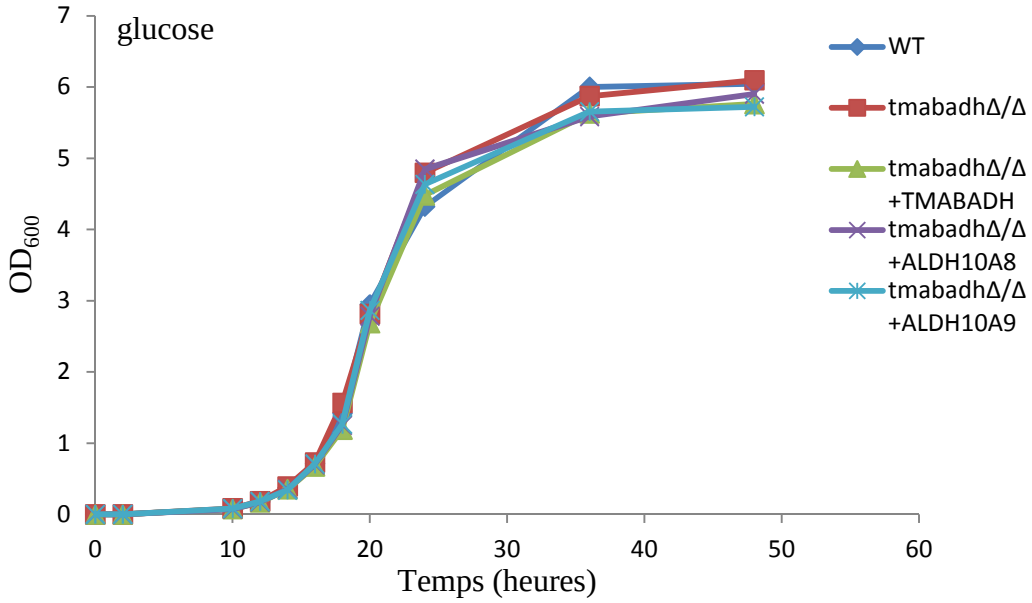
Figure 61: Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus avec les couples d'amorces spécifiques de *ALDH10A8* (A) et *ALDH10A9* (B) sur des colonies de la souche de *C. albicans tmabadh*Δ/Δ transformée par le vecteur pLUBP-*ALDH10A8* (A) et pLUBP-*ALDH10A9* (B) (M: marqueur de taille).
Puit 1: témoin positif ; puits 2 à 7: clones transformés; puit 8: témoin négatif

1.2 Expérience de complémentation

Les souches *tmabadh*Δ/Δ+*ALDH10A8* et *tmabadh*Δ/Δ+ *ALDH10A9* ainsi que la souche sauvage (SN076-P1), la souche mutante transformée avec le vecteur pLUBP vide *tmabadh*Δ/Δ URA^+ (CKS96) et la souche mutante *tmabadh*Δ/Δ+*TMABADH* complémentée avec le gène *TMABADH* de levure (CKS97) ont préalablement été cultivées sur un milieu contenant du glucose 2 % pendant 72 h pour éviter toute synthèse de carnitine.

Les différents clones ont ensuite été mis en culture dans un milieu liquide YNB + glucose contenant du glucose à la concentration de 2 % comme source de carbone d'une part et un milieu YNB + oléate contenant de l'acide oléique à la concentration de 0,12 % d'autre part. La croissance des souches de levure a été suivie par mesure de la densité optique pendant 48 h (**Figure 62**). Les clones ont également été striés sur boîte de milieu YNB contenant du glucose 2 % ou de l'acide oléique 0,12 % et photographiées après 24 heures pour le milieu glucose et 72 h pour le milieu oléate (**Figure 63**).

A



B

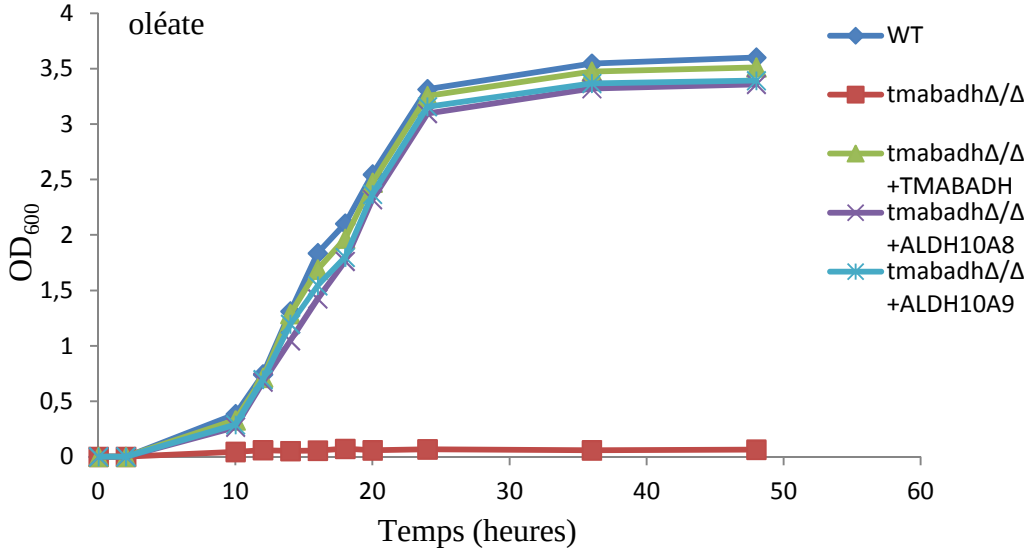


Figure 62: Croissance des souches de levure *C. albicans* sauvage SN076-P1 (WT), perte de fonction de la TMABADH (*tmabadh*Δ/Δ), complémentée par le gène *ALDH10A8* (*tmabadh*Δ/Δ+*ALDH10A8)* ou *ALDH10A9 (tmabadh*Δ/Δ+*ALDH10A9)*. A: Milieu glucose; B: Milieu oléate.

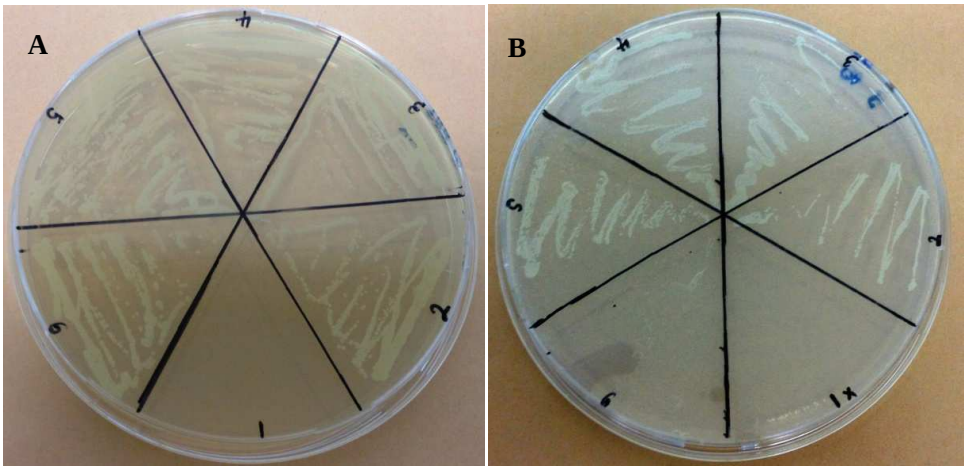


Figure 63: Croissance de souches de levure pendant 24 heures sur (A) milieu YNB + glucose 2 % après 24 heures sur (B) milieu YNB + oléate 0,12 % après 72 heures; 1: contrôle négatif (blanc); 2: souche sauvage SN076-P1; 3: *tmabadh*Δ/Δ+*TMABADH*, 4: *tmabadh*Δ/Δ+*ALDH10A8;* 5: *tmabadh*Δ/Δ+*ALDH10A9;* 6: *tmabadh*Δ/Δ.

L'ensemble des souches de levure utilisées dans cette expérience pousse très bien dans un milieu de culture contenant du glucose. Le mutant *tmabadh*Δ/Δ est quant à lui incapable de se développer dans un milieu contenant de l'oléate comme seule source de carbone. Par contre l'introduction d'une construction plasmidique contenant une cassette d'expression du gène *ALDH10A8* ou du gène *ALDH10A9* restaure parfaitement la capacité de croissance de ce mutant dans un milieu contenant de l'acide oléique. Les deux gènes de plante ont la même faculté à complémenter la mutation puisque la cinétique de croissance des levures est la même quelle que soit la construction utilisée (**Figure 62**).

1.3 Conclusion

Les deux gènes d'Arabidopsis *ALDH10A8* et *ALDH10A9* codent pour des protéines capables de restaurer la capacité d'une souche de levure *C. albicans* perte de fonction de la TMABADH à pousser dans un milieu de culture ne contenant que des acides gras comme source de carbone. Elles codent donc pour une enzyme capable de restaurer la voie de biosynthèse de la carnitine. La capacité de complémentation des deux enzymes de plante est comparable en terme d'efficacité.

2. Etude de l'expression des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* chez Arabidopsis

Les deux protéines de plante semblent équivalentes d'un point de vue fonctionnel lorsqu'elles sont exprimées chez la levure. Une étude comparée de l'expression des gènes

codant pour ces protéines a été initiée chez la plante afin de voir si leur profil d'expression était similaire.

2.1 Données bioinformatiques

Une analyse des données bioinformatiques disponibles sur l'expression des deux gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* a été réalisée à l'aide du site internet Arabidopsis eFP Browser (electronic Fluorescent Pictograph) (http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi) afin de visualiser leur niveau d'expression dans les différents organes de plante au cours du développement. Ce site permet d'aider à une interprétation des données d'expression génique provenant d'autres ensembles (GENEVESTIGATOR, TAIR, MAPMAN...). L'outil est conçu comme un moyen rapide et facile d'identifier les tissus concernés par l'expression d'un gène et est particulièrement utile pour mettre en relief des différences éventuelles entre les membres de familles de gènes.

2.1.1 Expression du gène *ALDH10A8*

La **figure 64** illustre l'expression du gène *ALDH10A8* (AT1G74920) dans les différents tissus au cours du développement d'Arabidopsis.

Le gène *ALDH10A8* semble être bien exprimé à tous les stades de développement et dans tous les organes d'Arabidopsis hormis le grain de pollen mature. Un plus faible niveau d'expression est mis en évidence dans les derniers stades de développement de la graine.

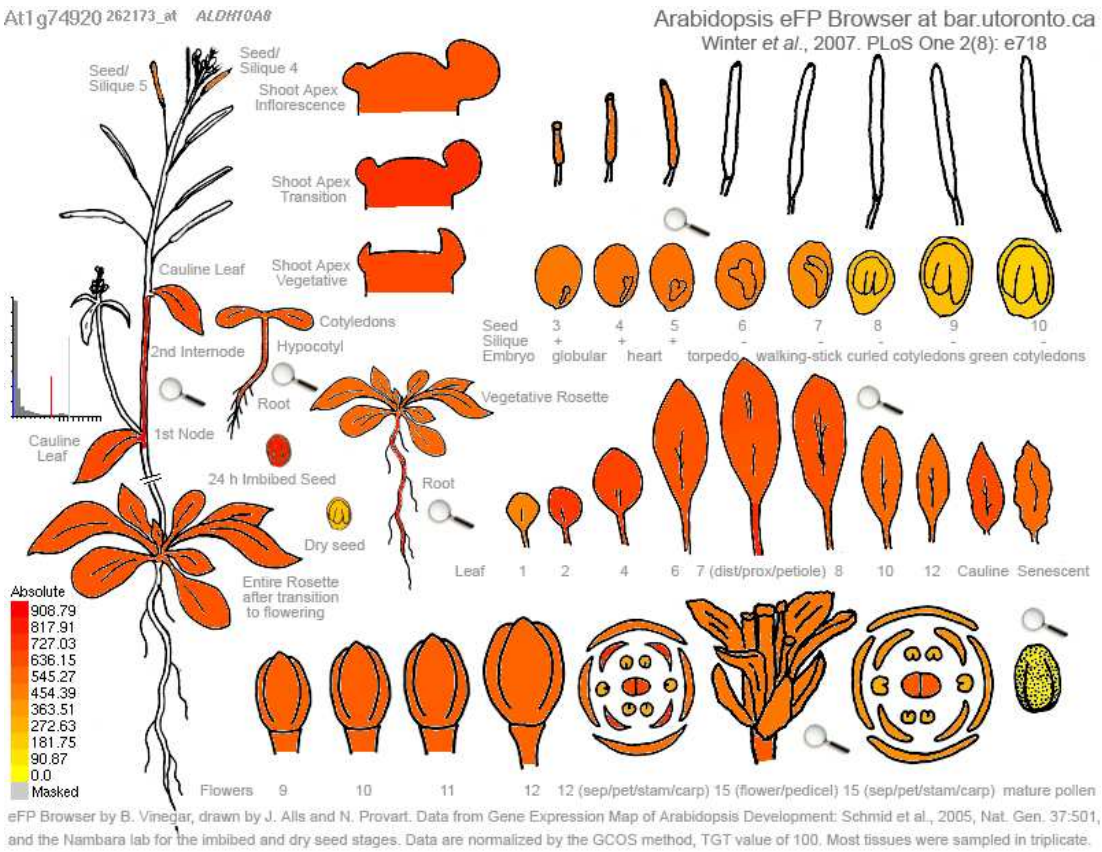


Figure 64: Analyse de l'expression du gène *ALDH10A8* dans les différents tissus au cours du développement d'Arabidopsis. Le niveau d'expression du gène dans chaque tissu est comparé au signal le plus élevé enregistré pour ce gène (jaune: niveau d'expression nul; rouge: niveau d'expression élevé).

2.1.2 Expression du gène *ALDH10A9*

De la même manière la **figure 65** illustre l'expression du gène *ALDH10A9* (AT3G48170) dans les différents tissus au cours du développement d'Arabidopsis.

Le gène *ALDH10A9* est également exprimé à tous les stades de développement et dans tous les organes hormis le pollen mature avec une expression plus faible dans les derniers stades de développement de la graine.

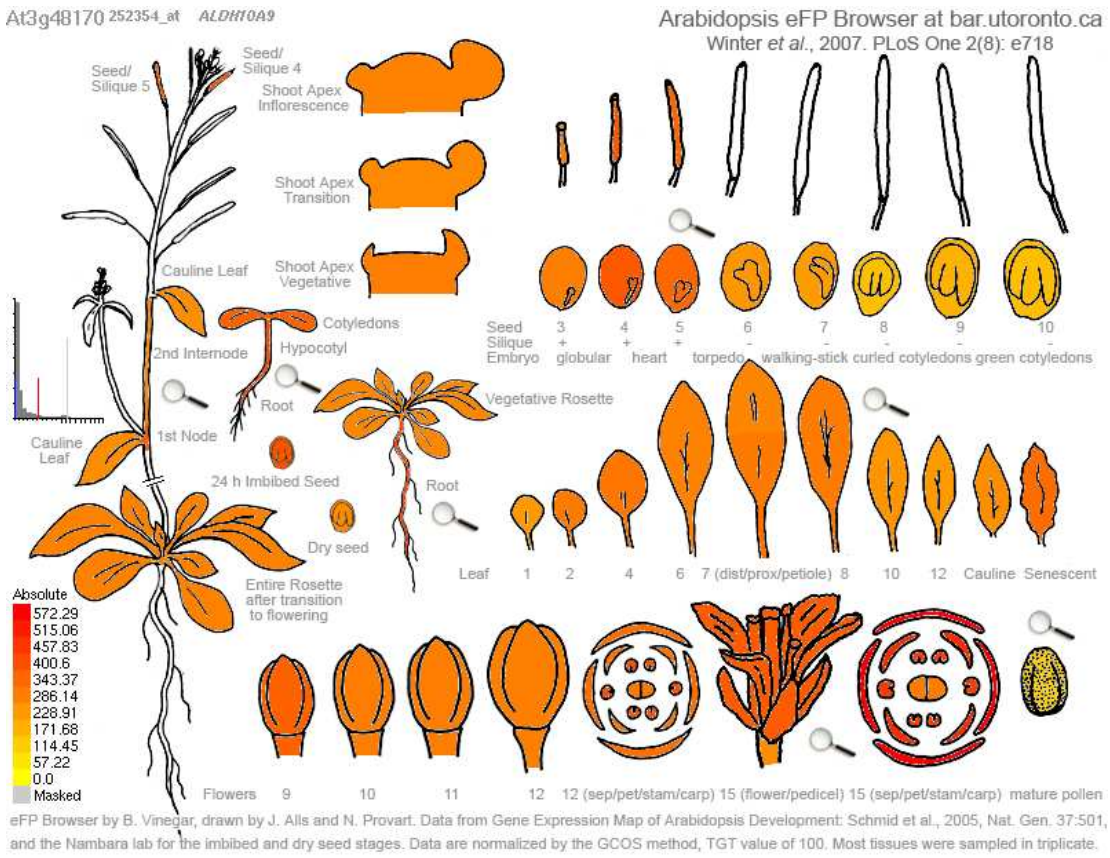


Figure 65: Analyse de l'expression du gène *ALDH10A9* dans les différents tissus au cours du développement d'Arabidopsis. Le niveau d'expression du gène dans chaque tissu est comparé au signal le plus élevé enregistré pour ce gène (jaune: niveau d'expression nul; rouge: niveau d'expression élevé).

2.1.3 Comparaison de l'expression des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9*

Une analyse comparative de l'expression des deux gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* a également été réalisée à l'aide du site eFP Browser (**Figure 66**).

Le gène *ALDH10A9* semble être d'avantage exprimé que le gène *ALDH10A8* dans les stades précoces et tardifs de développement de la graine, dans la graine sèche, les pétales et sépales de la fleur mature ainsi que dans le pollen mature. Le gène *ALDH10A8* est faiblement surexprimé dans les feuilles hormis dans les feuilles sénescentes. Il l'est d'avantage lors de la transition florale des bourgeons végétatifs.

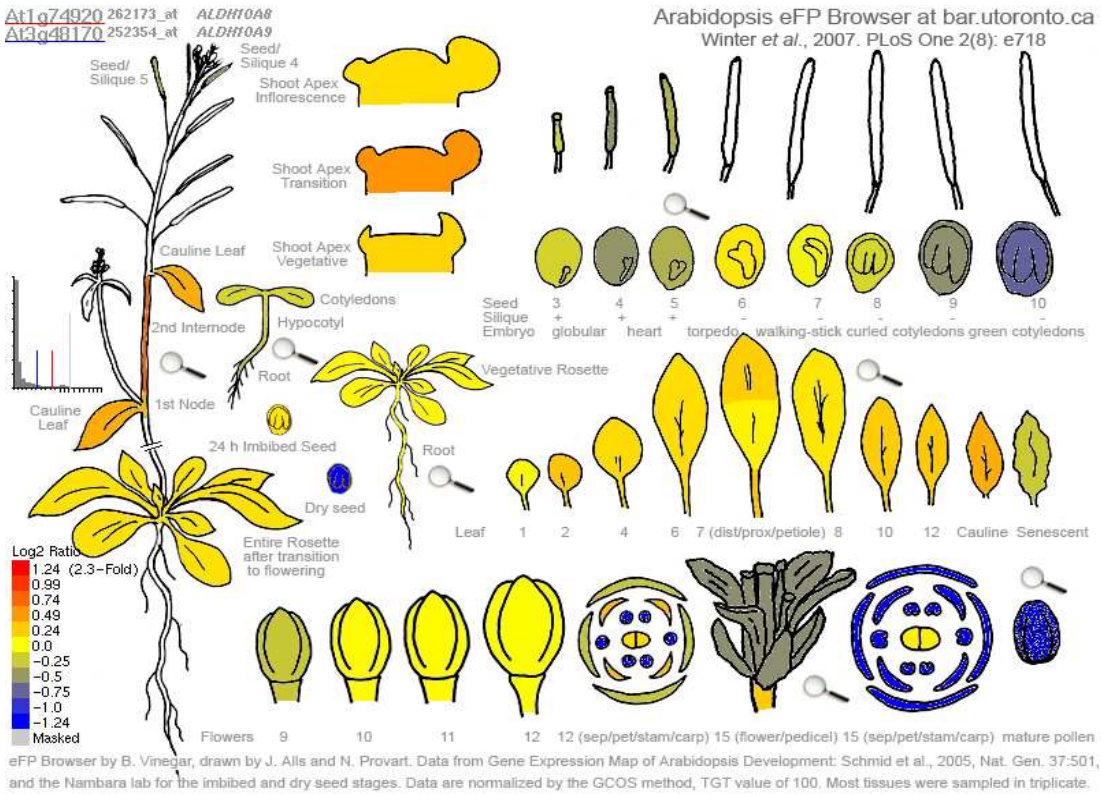


Figure 66: Comparaison du niveau d'expression du gène *ALDH10A8* par rapport à celle du gène *ALDH10A9* dans les différents tissus au cours du développement d'Arabidopsis.

2.1.4 Conclusion

Une analyse bioinformatique des données d'expression disponibles sur les deux gènes codant pour les ALDH10 de plante montre qu'ils sont exprimés dans quasiment tous les organes et à quasiment tous les stades de développement de la plante avec quelques différences entre les deux gènes. Il a cependant été nécessaire de vérifier ces données par quelques analyses sur des tissus végétaux.

2.2 Etude de l'expression des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* dans les plantes d'Arabidopsis

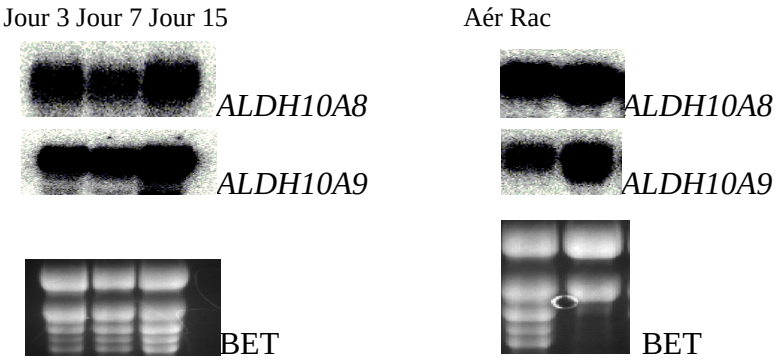
2.2.1 Etude de l'expression des gènes au cours de la croissance de jeunes plantules

Pour étudier l'expression des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* au cours de la croissance de jeunes plantules, des graines d'Arabidopsis Col-0 ont été semées sur du milieu M&S. Une extraction des ARN totaux a été faite sur des plantules de 3, 7 et 15 jours de développement et

sur les parties aériennes et racinaires de plantules de 11 jours. Un Northern Blot a été réalisé avec ces ARN totaux à l'aide de sondes spécifiques des gènes *ALDH10A8* (amplifiée par PCR à partir du vecteur pGEM®-T+*ALDH10A8* et des amorces AY093071_RT_fwd et ZY024) et *ALDH10A9* (amplifiée par PCR à partir du vecteur pGEM®-T+*ALDH10A9* et des amorces AF370333_RT_fwd et ZY014) (**Figure 67**).

Les résultats montrent que les deux gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* sont bien exprimés au cours de la croissance de jeunes plantules d'Arabidopsis. Il semble que le gène *ALDH10A8* soit exprimé de manière plus importante après 15 jours de développement (1,9 fois plus d'expression à 15 jours qu'à 3 jours). Le niveau d'expression du gène *ALDH10A9* varie peu au cours du temps et dans nos conditions expérimentales. De plus les gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* semblent être d'avantage exprimés dans les racines que dans les parties aériennes de plantules de 11 jours (1,3 fois plus d'expression pour le gène *ALDH10A8* et 1,8 fois plus d'expression pour le gène *ALDH10A9*).

A



B

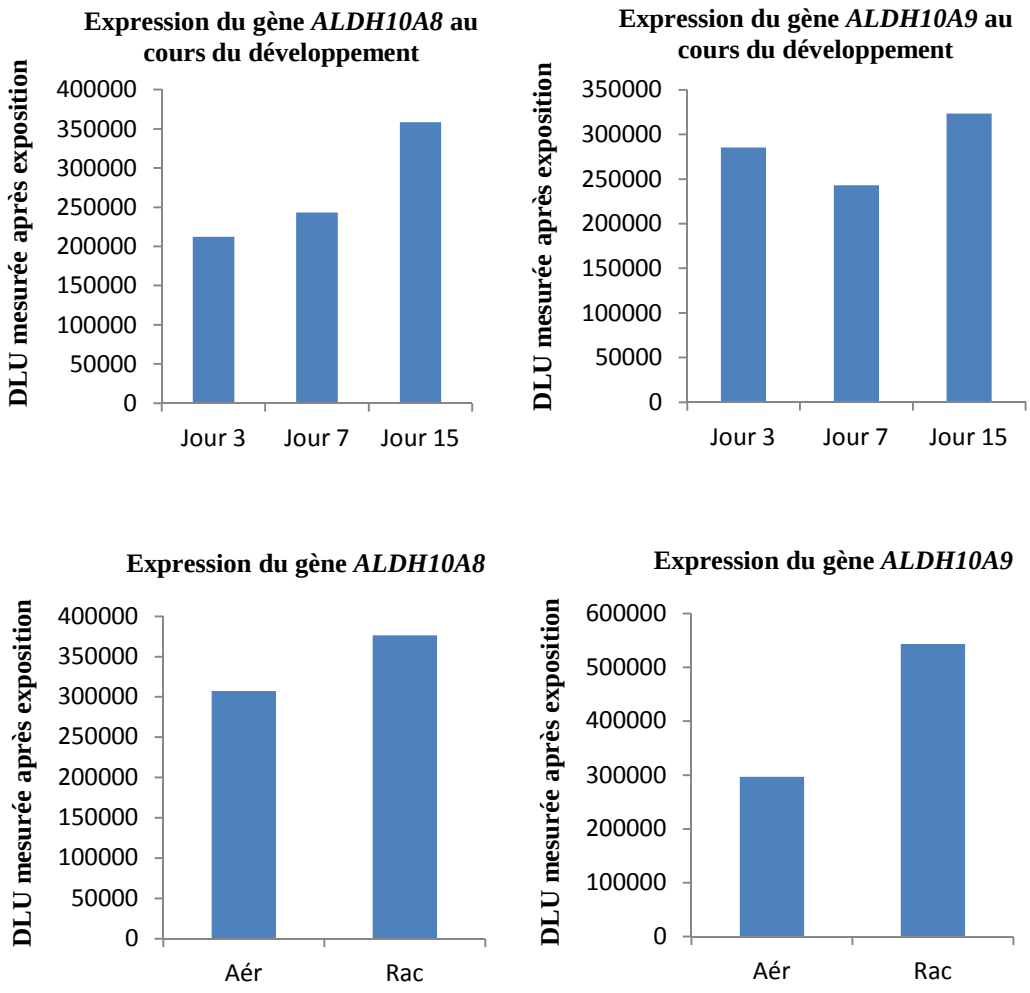


Figure 67: Profils d'expression des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* au cours de la croissance de jeunes plantules. Aér: partie aérienne ; Rac: partie racinaire.

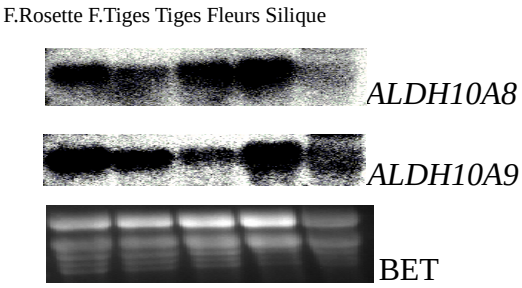
A: Northern Blots et coloration au BET des ARN totaux sur gel dénaturant.

B: Quantification de l'expression des ARNm *ALDH10A8* et *ALDH10A9* corrigée par rapport à l'intensité de l'ARNr 18S sur le gel coloré au BET (DLU, digital light units).

2.2.2 Etude de l'expression des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* dans les différents organes de plantes

Des plantules de 15 jours cultivées sur milieu M&S ont été transférées en serre. Un prélèvement de différents organes (feuilles de rosettes, feuilles de tiges, fragments de tige, fleurs et siliques matures) a été réalisé après 30 jours de développement. Une extraction des ARN totaux a été faite sur ces prélèvements et un Northern Blot a été réalisé avec des sondes spécifiques des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* (**Figure 68**).

A



B

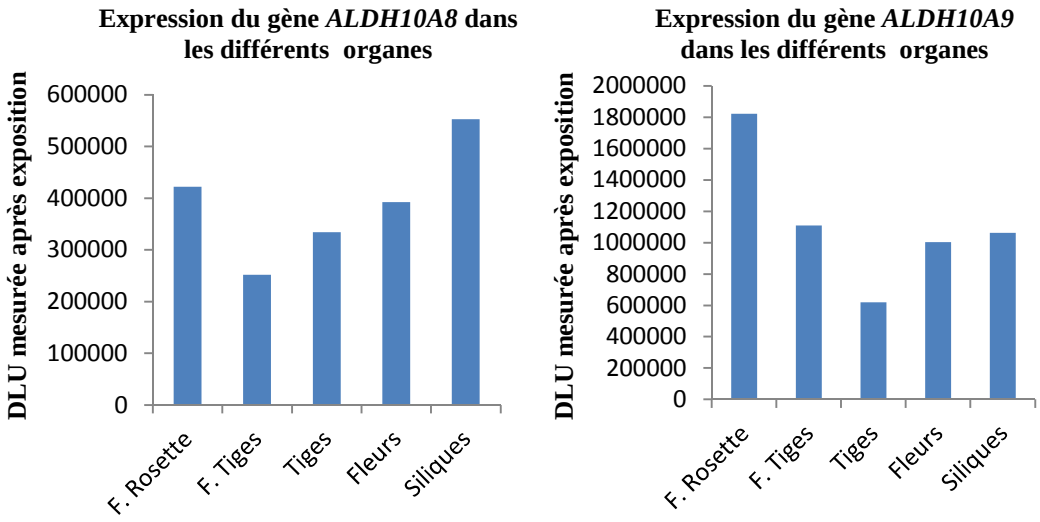


Figure 68: Expression des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* dans différents organes de plantes d'Arabidopsis de 30 jours.

A: Northern Blots et coloration au BET des ARN totaux sur gel dénaturant.

B: Quantification de l'expression des ARNm corrigée par rapport à l'intensité de l'ARNr 18S sur le gel coloré au BET; F. Rosette: Feuilles des Rosettes, F. Tiges: Feuilles des Tiges (DLU: digital light units).

Ces résultats confirment que les gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* sont exprimés dans tous les organes testés de plantes d'Arabidopsis. Ils montrent un niveau d'expression plus faible dans les feuilles des tiges que dans les feuilles des rosettes pour les deux gènes (environ 1,6 fois plus faible). Le gène *ALDH10A9* semble plus faiblement exprimé dans les tiges que dans les autres organes et plus fortement dans les feuilles de rosette. L'expression la plus faible mise en évidence pour le gène *ALDH10A8* est celle des tiges tandis qu'elle apparait plus forte dans les siliques matures. Les deux gènes ont donc un profil d'expression légèrement différent selon les organes.

2.2.3 Conclusion

Les données informatiques et nos analyses montrent que les gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* sont exprimés dans quasiment tous les organes de plantes et à tous les stades. Les expériences de Northern Blots montrent que leur expression est facilement détectable. Ces gènes sont légèrement surexprimés dans les parties racinaires par rapport aux parties aériennes de jeunes plantules. Le profil d'expression des deux gènes montre quelques différences.

2.3 Analyse de l'expression des gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* chez les mutants

Dans la mesure où les deux protéines ALDH10A8 et ALDH10A9 sont identiques à 80 % et similaires à 91 % et qu'elles ont la même efficacité pour complémenter un mutant de levure perte de fonction de la TMABADH il est possible qu'elles aient chacune un rôle compensateur chez le mutants perte de fonction de ALDH10A8, *KO8-2*, et chez les mutants présentant une baisse d'expression de ALDH10A9, *KD9-1* et *KD9-2*.

2.3.1 Analyse de l'expression du gène *ALDH10A9* chez *K08-2*

Afin de comparer l'expression du gène *ALDH10A9* entre la plante sauvage Col-0 et le mutant *KO8-2*, des graines des deux plantes ont été semées sur du milieu M&S. Après 3 jours de culture les plantules ont été récoltées et les ARN totaux ont été extraits. Une analyse par RT-PCR quantitative à l'aide des amorces 10A9-Fwd et 10A9-Rev a été réalisée (**Figure 69**).

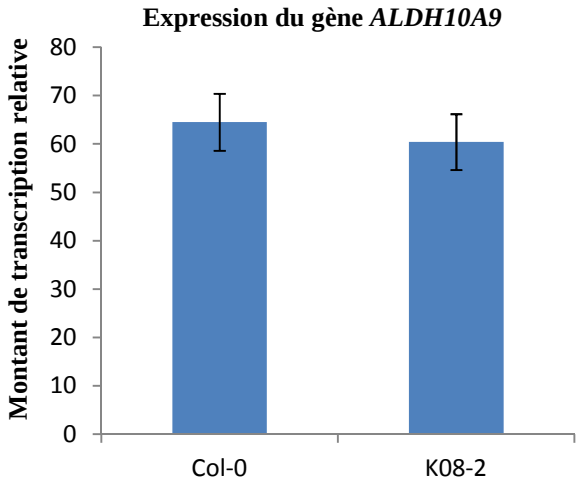


Figure 69: Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression du gène *ALDH10A9* chez Col-0 et le mutant *KO8-2*.

La perte de fonction du gène *ALDH10A8* est sans influence sur l'expression du gène *ALDH10A9*.

2.3.2 Analyse de l'expression du gène *ALDH10A8* chez les mutants *KD9-1* et *KD9-2*

De la même manière, une expérience de RT-PCR quantitative a été réalisée sur les mutants *KD9-1* et *KD9-2* avec les amorces 10A8-Fwd et 10A8-Rev (**Figure 70**) sur des ARN totaux de plantules de 3 jours.

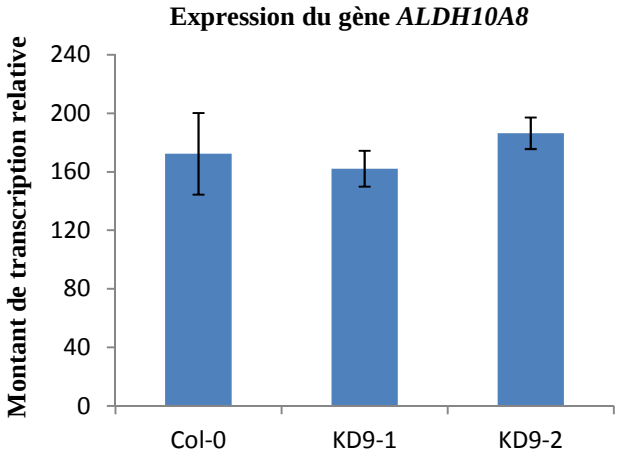


Figure 70: Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression du gène *ALDH10A8* chez Col-0 et les mutants *KD9-1* et *KD9-2*.

L’expression du gène *ALDH10A8* est comparable chez les plantes sauvages Col-0 et les mutants *KD9-1* et *KD9-2*.

3. Discussion et perspectives

Les deux gènes de plante *ALDH10A8* et *ALDH10A9* sont capables de complémenter d’un point de vue fonctionnel une mutation de la levure *C. albicans* perte de fonction de la TMABADH. Les protéines végétales restaurent la capacité de la levure à croître dans un milieu de culture contenant des AG comme seule source de carbone totalement dépendante de la carnitine chez cet organisme. Ce travail montre donc non seulement la capacité des protéines ALDH10A8 et ALDH10A9 à convertir le TMABA en γ-BB, mais aussi qu’elles peuvent être impliquées indirectement dans le métabolisme des AG chez les végétaux à l’instar de la levure. Ces deux protéines ont donc certainement un rôle métabolique plus important que le simple rôle de détoxification des aldéhydes en condition de stress pour lequel elles ont jusqu’ici été proposées (Missihoun *et al.*, 2011).

Une caractérisation structurale et cinétique des ALDH10 de maïs et de tomate comparée aux données déjà disponibles sur les enzymes de pois a permis d’étudier les résidus du site actif importants pour la spécificité de substrat de ces protéines (Kopecny *et al*., 2013; Tylichova *et al.*, 2010). Un tryptophane en position 288 et une conservation de la tyrosine 163 et des tryptophanes 170 et 459 (numérotation correspondant à la séquence des acides aminés des PsAMADH) confère une forte affinité aux ω-aminoaldéhydes et notamment à l’APAL en tant que meilleur substrat. Une modification de l’acide aminé en position 288 semble être associée à une meilleure affinité pour le TMABAL. Un alignement des séquences des protéines ALDH10A8 et ALDH10A9 avec les PsAMADH met en évidence une très bonne conservation des résidus du site actif et un résidu tryptophane en position 288 (**Tableau 26**). Il est donc possible que les enzymes d’Arabidopsis aient une affinité plus importante pour un autre aminoaldéhyde que le TMABAL.

Tableau 26: Comparaison de résidus du site actif des ALDH10 d'*A. thaliana* et des PsAMADH de *P. sativum* (la numérotation des acides aminés correspond à la séquence des protéines de pois, d'après Kopecny *et al*., 2013). Les résidus indiqués en grisé sont conservés entre les quatre protéines.

	D110	D113	N162	Y163	L166	M167	W170	E260	F284
PsAMADH1	D	D	N	Y	L	M	W	E	F
PsAMADH2	D	D	N	Y	L	M	W	E	F
ALDH10A8	D	D	N	Y	L	M	W	E	F
ALDH10A9	D	D	N	Y	L	M	W	E	F

	W288	I293	C294	S295	I444	Q451	P452	C453	W459	C-term
PsAMADH1	F	I	C	S	I	Q	P	S	W	SKL
PsAMADH2	W	I	C	S	I	Q	P	C	W	AKL
ALDH10A8	W	I	C	S	I	Q	P	C	W	N--
ALDH10A9	W	I	C	S	I	Q	P	C	W	SKL

Bien qu'équivalente en terme de fonctionnalité chez la levure ces deux protéines ne sont pas équivalentes et redondantes chez la plante. La perte de fonction de *ALDH10A8* n'entraine pas de surexpression du gène *ALDH10A9* et une baisse d'expression d'*ALDH10A9* n'est pas compensée par une surexpression de *ALDH10A8*. D'autre part, bien que ces gènes soient bien exprimés à tous les stades de développement et dans quasiment tous les organes de plante, les profils d'expression des deux gènes montrent quelques différences. Le contrôle transcriptionnel de ces deux gènes est donc différent. D'autre part les protéines ont des localisations sub-cellulaires différentes (Missihoun et *al.*, 2011).

D'une manière intéressante, nos expérimentations ont mis en évidence une surexpression des deux gènes dans les racines d'Arabidopsis, or des travaux réalisés antérieurement ont montré une accumulation légèrement plus importante de carnitine dans les racines de plantules d'Arabidopsis que dans les parties végétatives (Bourdin *et al.*, 2007). Cette accumulation est donc peut-être liée à une augmentation de la teneur en γ-BB, ce qui pourra être vérifié par LC-ESI-MS/MS.

L'étude de l'expression des deux gènes chez de jeunes plantules semble indiquer une expression plus forte à 15 jours de développement. L'analyse de la teneur en carnitine lors des stades précoces de développement de la plantule a montré que la teneur maximale était atteinte entre 48 h et 72 h (Bourdin, 2007) pour diminuer ensuite. Les protéines ALDH10A8 et ALDH10A9 intervenant bien dans la synthèse de la carnitine, nos résultats montrent que la

régulation de la teneur en carnitine ne se fait pas au niveau du taux de transcription des deux gènes correspondant mais pourrait se faire par exemple au niveau de la synthèse des enzymes correspondantes ou bien de la disponibilité du précurseur γ-BB ce qui pourra là encore être vérifié par LC-ESI-MS/MS.

Une étude antérieure réalisée dans le cadre de la thèse d'Aurélie Charrier (2011) a permis l'étude de l'expression des gènes induits lors d'une supplémentation du milieu de culture de plantules d'Arabidopsis en γ-BB ou carnitine par des analyses de micro-arrays. Aucun des deux gènes *ALDH10A8* et *ALDH10A9* n'est apparu être régulé par ces apports exogènes. Néanmoins il sera nécessaire de confirmer l'absence d'effet de la γ-BB ou de la carnitine sur l'expression des deux gènes d'*ALDH10* par RT-PCR quantitative par exemple.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La compréhension du rôle biologique de la carnitine chez les plantes passe par une identification des enzymes impliquées soit dans sa voie de biosynthèse, soit dans les activités liées à son rôle de transfert des acides gras de part et d'autre des membranes (activités de transférases, activités de translocases) identifiées chez les mammifères ou les levures. Jusqu'ici les recherches menées sur un homologue de carnitine acyl-translocase d'Arabidopsis n'ont pas permis une avancée dans la connaissance des activités enzymatiques associées à la carnitine (Bourdin, 2007) et nos recherches dans les banques de protéines ne nous ont pas permis de proposer des candidats pour les activités transférases de groupement acyles bien que l'existence de telles activités aient été démontrées (Burgess et Thomas, 1986; Masterson et Wood, 2000[1][2]). Aussi, la mise en évidence d'une similitude entre les voies de biosynthèse de mammifères, de levure et de plante et l'existence de protéines végétales homologues aux enzymes en charge de la synthèse de carnitine chez les animaux et la levure *C. albicans* a permis de proposer des candidats susceptibles d'être impliqués dans la voie de biosynthèse de la carnitine chez Arabidopsis (Rippa *et al.*, 2012).

Ainsi des protéines végétales sont homologues aux protéines en charge de la conversion de l'HTML en TMABA, ce qui correspond à la deuxième étape de la voie de biosynthèse de la carnitine chez les mammifères et la levure *C. albicans*. Cette étape cependant n'est pas encore bien caractérisée chez ces organismes. En effet, si une SHMT est proposée chez l'homme pour être une HTMLA (Henderson *et al.*, 1980; Henderson *et al.*, 1982), deux enzymes appartenant à la famille des THA sont impliquées à cette étape chez *C. albicans* (GLY1 et HTMLA) avec également l'intervention possible d'une forme cytosolique de SHMT (Strijbis *et al.*, 2009; Strijbis *et al.*, 2010).

D'après nos données, les protéines THA d'Arabidopsis ne semblent pas impliquées dans la synthèse de carnitine. En effet le mutant faible *tha1-1* et les mutants perte de fonction *tha2-1* et *tha2-2*, ne présentent pas de diminution de la teneur en carnitine. Au contraire des plantules des mutants *tha2-1* et *tha2-2* contiennent 2 à 5 fois plus de carnitine que des plantules sauvages. Cependant, dans la mesure où nos analyses ne permettent pas une quantification de la TMABA, il est possible qu'une compensation de la voie de biosynthèse de la carnitine ait lieu à ce niveau (si plusieurs enzymes sont impliquées) ou en aval de cette étape. Des analyses effectuées sur le mutant faible *shmt1-1* montrent au contraire une réduction de la teneur en γ-BB de 29,8 % et en carnitine totale de 28,1 %. Si une implication de l'enzyme SHMT1 est possible dans la voie de synthèse de la carnitine, son activité est prépondérante sur une éventuelle implication de THA,

tout comme chez la levure l'activité de l'HTMLA est prépondérante sur l'activité de GLY1. En effet la perte de fonction de GLY1 n'entraine un effet sur la croissance des levures dans un milieu oléate que lorsque l'HTMLA est également mutée (Strijbis *et al.*, 2010). Au cours de cette thèse nous n'avons pas étudié la capacité de l'enzyme SHMT1 à synthétiser la TMABA et la baisse de teneur en carnitine que nous avons mise en évidence est peut-être une conséquence métabolique indirecte de la perte partielle d'activité de l'enzyme.

Dans la mesure où la diminution de teneur en carnitine n'est que de 29 % chez *shmt1-1*, où plusieurs enzymes peuvent être impliquées à cette étape de la voie de biosynthèse (d'autant que nous n'avons pas pu tester l'implication éventuelle d'autres SHMT au cours de ce travail) et dans la mesure où cette étape de la voie de biosynthèse est assez en amont de la synthèse du précurseur de la carnitine, nous n'avons pas poursuivi nos investigations sur SHMT1. D'autre part des arguments bibliographiques permettaient d'envisager plus certainement d'autres candidats. Quoiqu'il en soit, nous avons démontré que le mutant *shmt1-1* est un mutant qui présente une teneur significativement réduite en carnitine et l'obtention de mutants carnitine constituait un des objectifs principaux de ce travail de thèse. La protéine SHMT1 étant impliquée dans la photorespiration (Moreno *et al.*, 2005; Voll *et al.*, 2006), il est possible qu'un lien existe entre la carnitine et la photorespiration chez Arabidopsis. L'implication de SHMT1 dans la voie de biosynthèse de la carnitine reste à démontrer.

La conversion de la TMABA en γ-BB, qui est le précurseur direct de la carnitine chez les animaux et la levure *C. albicans*, est réalisée par une TMABADH (Vaz *et al.*, 2000). Chez Arabidopsis les protéines de la famille ALDH2 sont les plus proches de l'enzyme de levure avec une identité de séquence de 46 à 48 %. Cependant nos dosages de carnitine sur des plantules de mutants des protéines ALDH2B4, ALDH2B7 et ALDH2C4 ne vont pas dans le sens d'une implication des trois protéines végétales dans la synthèse de carnitine.

Les protéines ALDH10A8 et ALDH10A9 identiques à 38 et 39 % à la protéine animale et à 42 % à la protéine de levure (avec une similarité de séquence d'environ 57 %) semblaient être de très bons candidats au démarrage de cette thèse du fait de données bibliographiques sur la capacité de conversion *in vitro* du substrat TMABA en γ-BB des homologues de pois (Tylichova *et al.*, 2010). Au cours de cette étude nous avons démontré que ces protéines végétales sont capables de complémenter d'un point de vue fonctionnel une perte de fonction de la TMABADH chez un mutant de *C. albicans*, démontrant ainsi pour la première fois l'activité TMABADH *in vivo* de protéines ALDH10 de plante. Nous avons également démontré que les mutants d'Arabidopsis *KO8-2* (perte de fonction du gène *ALDH10A8*) et *KD9-1, KD9-2* (baisse de fonction du gène *ALDH10A9*) ont une teneur significativement réduite en γ-BB et en carnitine. Ces données réunies montrent que ces enzymes *in planta* sont

impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine en permettant la synthèse de la γ-BB.

Notre travail de recherche a également permis pour la première fois d'obtenir des mutants de la protéine ALDH10A9. La transformation de plantes par des constructions permettant l'expression de micro-ARN ciblant le transcrit du gène *ALDH10A9* a démontré que l'obtention de mutant perte de fonction de ce gène n'est pas possible. Ceci confirme l'hypothèse d'une létalité de cette mutation émise suivant le fait qu'aucun mutant perte de fonction n'a jusqu'ici été trouvé dans les banques de mutants d'Arabidopsis (Missihoun *et al.*, 2011). Dans la mesure où une mutation perte de fonction de *ALDH10A8* est sans effet sur le développement des plantes en conditions normales ceci démontre également un rôle majeur de la protéine ALDH10A9 péroxysomale par rapport à son homologue localisé dans le leucoplaste pour le développement de la plante.

D'autre part, l'ensemble des données obtenues au cours de cette étude sur les dosages de carnitine menés parallèlement aux dosages de γ-BB confirment le lien métabolique direct existant entre ces deux molécules chez Arabidopsis. En effet une diminution de 29 % chez *shmt1-1*, de 61 % chez *KO8-2* et de 82 % chez *KD9-1* et *KD9-2* de la γ-BB entraine une diminution de 28 %, 57 % et 65 % respectivement de la carnitine totale. Ceci confirme la similarité existant entre les voies de biosynthèse de mammifères, de levure et de plante.

Au cours de ce travail, nous avons montré également que la protéine ALDH10A8 n'est pas impliquée dans la synthèse de glycine bétaïne chez Arabidopsis alors que les protéines ALDH10 sont proposées en tant que BADH dans les banques de protéines. Bien que la non implication de ALDH10A9 dans la synthèse de ce composé reste à confirmer, les données disponibles sur les acides aminés du site actif de cette enzyme excluent cette éventualité (Kopecny *et al.*, 2013).

L'étude menée sur les phénotypes des plantes exprimant un micro-ARN ciblant le transcrit du gène *ALDH10A9* au cours de trois générations sur des lignées viables, montre une disparition des effets sur la germination et le développement post-germinatif au fil des générations. A ce stade de notre travail, nous ne savons pas si les effets délétères de la perte de fonction ou baisse de fonction de *ALDH10A9* sont liés ou non à la carnitine. En effet, un apport exogène de carnitine à la concentration de 5 mM dans le milieu de culture de graines *amiRNA1* Col-0 ou *KO8-2* à la génération T1 n'améliore pas la capacité de germination de ces graines. Il est possible cependant que la carnitine exogène ne compense pas un besoin métabolique local vital pour les plantules notamment au niveau du péroxysome. D'autre part bien que la baisse de carnitine mesurée à la troisième génération de plantes soit significative (plus de 64 %) nous n'avons pas d'information sur cette teneur dans les plantes des générations précédentes (elle

pourrait être encore plus faible). Il est possible qu'un seuil de carnitine, ou de son précurseur, la γ-BB, soit nécessaire à la viabilité des plantes. Mais ce phénotype peut tout aussi bien être lié à la baisse de fonction de détoxification des aldéhydes produits lors de la germination (Missihoun *et al.*, 2011; Kopecny *et al.*, 2013) qui serait capitale pour la forme péroxysomale de l'enzyme ALDH10A9. Nos données suggèrent la mise en place d'une compensation métabolique de la mutation de *ALDH10A9* au cours des générations, qui ne passe pas par une surexpression du gène *ALDH10A8.*

En perspectives à ce travail, pour avancer dans la connaissance sur la voie de biosynthèse de la carnitine, il faudra déterminer quelles enzymes végétales interviennent dans la conversion de l'HTML en TMABA. L'utilisation de mutants végétaux nécessitera la quantification de la TMABA pour laquelle une synthèse chimique est possible (Vaz *et al.*, 2010) avec une mise au point des paramètres d'analyses de LC/ESI-MS-MS. Au préalable, des constructions plasmidiques permettant l'expression des protéines candidates dans le double mutant *htmla/gly1* de *C. albicans* (Strijbis *et al.*, 2009) sera un moyen efficace de tester la capacité des enzymes de plante à prendre en charge l'HTML pour le convertir en TMABA.

A ce jour, nous n'avons pas d'information sur l'enzyme de plante qui pourrait être en charge de la conversion de γ-BB en carnitine chez Arabidopsis. Ayant démontré la possibilité d'utiliser des mutants de levure *C. albicans* pour tester des protéines d'Arabidopsis susceptibles d'être impliquées dans la voie de bisosynthèse de la carnitine par nos expériences de complémentation, il serait envisageable de réaliser une banque de cDNA de la plante pour transformer le mutant de levure BBDΔ/Δ existant (Strijbis *et al.*, 2009). Les clones de levure capables de pousser sur un milieu oléate contiendraient dans ce cas une séquence de plante codant pour une enzyme capable de convertir le précurseur de la carnitine en carnitine. Une recherche de ce type permettra de proposer également des candidats pour effectuer la conversion de TML en HTML, première étape de la voie de biosynthèse animale et de levure, en utilisant le mutant TMLDΔ/Δ (Strijbis *et al.*, 2009). Ces deux réactions de déshydrogénation se faisant sur des substrats très proches, il est possible qu'une seule protéine soit impliquée pour réaliser ces deux étapes chez la plante.

Les mutants *KO8-2, KD9-1* et *KD9-2,* sont désormais des outils disponibles pour étudier le rôle biologique de la carnitine chez Arabidopsis. Ces lignées devront être étudiées individuellement et croisées pour comparer l'impact de la perte de fonction du gène *ALDH10A8* et d'une baisse d'expression du gène *ALDH10A9* séparément ou conjointement. En effet les deux protéines étant localisées différemment dans la cellule, elles alimentent vraisemblablement en γ-BB et en carnitine différents processus biologiques. L'analyse des répercussions morphologiques et physiologiques sur le double mutant apportera donc des

éléments supplémentaires de connaissance renforçant l'étude des simples mutants (sous réserve de sa viabilité).

Ces mutants pourront être étudiés d'un point de vue développemental en conditions normales de culture et dans des conditions défavorables connues pour induire un processus d'adaptation sollicitant le métabolisme lipidique de manière accrue (stress froid, stress salin, stress oxydatif, déficience en phosphate (Zhang *et al.*, 2009; Moellering et Benning, 2011)). L'effet d'un apport exogène de carnitine ou de son précurseur la γ-BB dans les différentes conditions de culture pourra être étudié. Les études menées en conditions de stress salin renseigneront sur l'implication des ALDH10 dans la tolérance à ce stress déjà démontré (Missihoun *et al.*, 2011) qu'il soit lié ou non à la carnitine.

Une approche de lipidomique pourra être menée d'une part au cours du développement précoce en comparant le profil en acyl-carnitines et en acyl-CoA entre les mutants et le témoin sauvage afin d'étudier la corrélation entre l'activation des acides gras en acyl-CoA et l'apparition des acyl-carnitines, au cours de l'acquisition de la photoautotrophie qui correspond à une synthèse accrue de phospholipides membranaires. Des analyses de la composition lipidique des tissus végétatifs (racines, feuilles) et des graines par des techniques de chromatographie en couche mince et chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse permettront de mesurer l'implication de la carnitine dans le transfert des acides gras vers les différentes classes lipidiques (phospholipides, triglycérides), et notamment dans leur exportation des plastes pour la synthèse des phospholipides, et/ou leur importation dans le réticulum endoplasmique pour la synthèse des triglycérides comme dans les tissus animaux (Washington *et al*., 2003).

Une approche de transcriptomique par puce à ADN sur les mutants et le témoin sauvage permettra d'appréhender les répercussions métaboliques d'une déficience en carnitine de manière globale. Une attention devra être portée notamment sur l'expression de gènes des différentes voies du métabolisme lipidique et l'identification de gènes codant pour des enzymes qui pourraient avoir une activité associée à la carnitine (transférases ou translocases de groupement acyle). L'expression des autres gènes candidats identifiés comme susceptibles de participer à la biosynthèse de la carnitine au côté des ALDH10 devra également être étudiée.

La létalité du mutant perte de fonction de ALDH10A9 et le caractère très affecté d'un point de vue de la germination mis en évidence lors de la transformation des plantes *KO8-2* avec les constructions permettant d'exprimer un *amiRNA* ciblant le gène *ALDH10A9* amène également à envisager au contraire une surexpression des gènes *ALDH10* chez Arabidopsis par transgénèse. De la même manière de telles plantes pourront être étudiées d'un point de vue

développemental (en condition normale, ou affectée), par une approche de transcriptomique et de lipidomique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abe T, Takada K, Ohkawa K, Matsuda M, 1990, Purification and characterization of a rat brain aldehyde dehydrogenase able to metabolize γ-aminobutyraldehyde to γ-aminobutyric acid, *The Biochemical Journal*, **269**: 25-29.

Ajjawi I, Lu Y, Savage LJ, Bell SM, Last RL, 2010, Large-scale reverse genetics in Arabidopsis: case studies from the Chloroplast 2010 Project, *Plant physiology*, **152**: 529-540.

Angelidis AS, Smith GM, 2003, Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium, *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 7492-7498.

Arduini A, Mancinelli G, Radatti GL, Dottori S, Molajoni F, Ramsay RR, 1992, Role of carnitine and carnitine palmitoyltransferase as integral components of the pathway for membrane phospholipid fatty acid turnover in intact human erythrocytes, *Journal of Biological Chemistry*, **267**: 12673-12681.

Arduini A, **Denisova N**, **Virmani A**, **Avrova N**, **Federici G**, **Arrigoni-Martelli E**, 1994, Evidence for the involvement of carnitine-dependent long-chain acyltransferases in neuronal triglyceride and phospholipid fatty acid turnover, *Journal of Neurochemistry*, **62**: 1530-1538.

Arikit S, Yoshihashi T, Wanchana S, Uyen TT, Huong NT, Wongpornchai S, Vanavichit A, 2011, Deficiency in the amino aldehyde dehydrogenase encoded by GmAMADH2, the homologue of rice Os2AP, enhances 2-acetyl-1-pyrroline biosynthesis in soybeans (Glycine max L.), *Plant biotechnology journal*, **9**: 75-87.

Arrigoni-Martelli E, **Caso V**, 2001, Carnitine protects mitochondria and removes toxic acyls from xenobiotics, *Drugs under Experimental and Clinical Resserch*, **27**: 27-49.

Ashraf M, Foolad MR, 2007, Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance, *Environmental and Experimental Botany*, **59**: 206-216.

B

Beckman KB, Ames BN, 1998**,** The free radical theory of aging matures, *Physiological Reviews*, **78**: 547-581.

Benvenga S, **Amato A**, **Calvani M**, **Trimarchi F**, 2004, Effects of carnitine on thyroid hormone action, *Annals of the New York Academy Sciences*, **1033**: 158-167.

Bieber LL, **Krahling JB**, **Clarke PR**, **Valkner KJ**, **Tolbert NE**, 1981, Carnitine acyltransferases in rat liver peroxisomes, *Archives Biochemistry and Biophysics*, **211**: 599-604.

Binienda Z, Johnson JR, Tyler-Hashemi AA, Rountree RL, Sapienza PP, Ali SF, Kim CS, 1999, Protective Effect of L-Carnitine in the Neurotoxicity Induced by the Mitochondrial Inhibitor 3-Nitropropionic Acid (3-NPA), *Annals of the New York Academy of Sciences*, **890**: 173-178.

Bourdin B, Adenier H, Perrin Y, 2007, Carnitine is associated with fatty acid metabolism in plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**: 926-931.

Bourdin B, 2007, Etude de l'implication de la carnitine dans le transport intracellulaire des acides gras chez *Arabidopsis thaliana*, Thèse de l'Université de Technologique de Compiègne, Compiègne, France.

Bradbury LM, Gillies SA, Brushett DJ, Waters DL, Henry RJ, 2008, Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice, *Plant molecular biology*, **68**: 439-449.

Bremer J, 1962[1], Carnitine in intermediary metabolism. The metabolism of fatty acid esters of carnitine by mitochondria, *Journal of Biological Chemistry*, **237**: 3628-3632.

Bremer J, 1962[2], Carnitine precursors in the rat, *Biochimica et Biophysica Acta*, **57**: 327–335.

Bremer J, 1983, Carnitine-metabolism and functions, *Physiological reviews*, **63**: 1420-1480.

Brocker C, Vasiliou M, Carpenter S, Carpenter C, Zhang Y, Wang X, Kotchoni SO, Wood AJ, Kirch HH, Kopecny D, Nebert DW, Vasiliou V, 2013, Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics, *Planta*, **237**: 189-210.

Brown GC, 1999, Nitric oxide and mitochondrial respiration, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1411**: 351-369.

Burgess N, Thomas DR, 1986, Carnitine acetyltransferase in pea cotyledon mitochondria, *Planta*, **167**: 58-65.

Burwinkel B, Kreuder J, Schweitzer S, Vorgerd M, Gempel K, Gerbitz KD, Kilimann MW, 1999, Carnitine transporter OCTN2 mutations in systemic primary carnitine deficiency: a novel Arg169Gln mutation and a recurrent Arg282ter mutation associated with an unconventional splicing abnormality, *Biochemical and biophysical research communications*, **261**: 484-487.

C

Calabrese V, Stella AMG, Calvani M, Butterfield DA, 2006, Acetylcarnitine and cellular stress response: roles in nutritional redox homeostasis and regulation of longevity genes, *The Journal of nutritional biochemistry*, **17**: 73-88.

Canovas M, Bernal V, Sevilla A, Iborra JL, 2007, Salt stress effects on the central and carnitine metabolisms of *Escherichia coli*, *Biotechnology and Bioengineeing*, **96**: 722-737.

Charrier A, Rippa S, Yu A, Nguyen PJ, Renou JP, Perrin Y, 2012, The effect of carnitine on Arabidopsis development and recovery in salt stress conditions, *Planta*, **235**: 123-135.

Charrier A, 2011, Etude de l'implication de la carnitine dans la tolérance aux stress abiotiques chez *Arabidopsis thaliana*, Thèse de l'Université de Technologique de Compiègne, Compiègne, France.

Cho YO, Leklem JE, 1990, *In vivo* evidence for a vitamin B_6 requirement in carnitine synthesis, *The Journal of Nutrition*, **120**: 258-265.

Clough SJ, Bent AF, 1998, Floral dip: a simplified method for Agrobacterium ‐ mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal*, **16**: 735-743.

Cotton LM, Rodriguez CM, Suzuki K, Orgebine-Crist MC, Hinton BT, 2010, Organic cation/carnitine transporter, OCTN2, transcriptional activity is regulated by osmotic stress in epididymal cells, *Molecular reproduction and development*, **77**: 114-125.

D

Depicker A, De Wilde M, De Vos G, De Vos R, Van Montagu, Schell J, 1980, Molecular cloning of overlapping segments of the nopaline Ti-plasmid pTiC58 as a means to restriction endonuclease mapping, **3**: 193-211.

Dieuaide M, Couee I, Pradet A, Raymond P, 1993, Effects of glucose starvation on the oxidation of fatty acids by maize root tip mitochondria and peroxisomes: evidence for mitochondrial fatty acid beta-oxidation and acyl-CoA dehydrogenase activity in a higher plant, *Biochemical Journal*, **296**: 199-207.

Dunn WA, Aronson NN Jr, Englard S, 1982, The effects of 1-amino-D-proline on the production of carnitine from exogenous protein-bound trimethyllysine by the perfused rat liver, *The Journal of Biological Chemistry*, **257**: 7948-7951.

E

Eastmond PJ, Graham IA, 2001, Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds, *Trends in plant science*, **6**: 72-78.

Edgar AJ, 2005, Mice have a transcribed L-threonine aldolase/GLY1 gene, but the human GLY1 gene is a non-processed pseudogene, *BioMedCentral Genomics*, **6**: 32-43.

Eisenhut M, Planchais S, Cabassa C, Guivarch A, Justin AM, Taconnat L, Renou JP, Linka M, Gagneul D, Timm S, Bauwe H, Carol P, Weber APM, 2013, Arabidopsis A BOUT DE SOUFFLE is a putative mitochondrial transporter involved in photorespiratory metabolism and is required for meristem growth at ambient CO2 levels, *The Plant Journal*, **75**: 836-849.

Elgersma Y, van Roermund CW, Wanders RJ, Tabak HF, 1995, Peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferases of *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single gene, The *EMBO Journal*, **14**: 3472-3479.

Engel N, Ewald R, Gupta KJ, Zrenner R, Hagemann M, Bauwe, H, 2011, The presequence of Arabidopsis serine hydroxymethyltransferase SHM2 selectively prevents import into mesophyll mitochondria, *Plant physiology*, **157**: 1711-1720.

Englard S, 1979, Hydroxylation of γ-butyrobetaine to carnitine in human and monkey tissues, *FEBS Letters*, **102**: 297-300.

F

Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MDP, Garrett Q, 2010, Review Role of carnitine in disease, *Nutrition and Metabolism*, **7**: 30-44.

Fraenkel G, Blewett M, Coles M, 1948, B_T, a new vitamin of the B-group and its relation to the folic acid group, and other anti-anaemia factors, *Nature*, **161**: 981-983.

Fraisier V, Gojon A, Tillard P, Daniel-Vedele, F, 2000, Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source, *The Plant Journal*, **23**: 489-496.

Franken J, Kroppenstedt S, Swiegers J, Bauer F, 2008, Carnitine and carnitine acetyltransferases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* : a role for carnitine in stress protection, *Current Genetics*, **53**: 347-360.

Fraser F, **Zammit VA**, 1999, Submitochondrial and subcellular distributions of the carnitine-acylcarnitine carrier, *FEBS Letters*, **445**: 41-44.

Fritiz I, 1955, The effects of muscle extracts on the oxidation of palmitic acid by liver slices and homogenates, *Acta Physiologica Scandinavica*, **34**: 367-385.

G

Galland S, Le Borgne F, Guyonnet D, Clouet P, Demarquoy J, 1998, Purification and characterization of the rat liver γ-butyrobetaine hydroxylase, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **178**: 163-168.

Galland S, Le Borgne F, Bouchard F, Georges B, Clouet P, Grand-Jean F, Demarquoy J, 1999, Molecular cloning and characterization of the cDNA encoding the rat liver gamma-butyrobetaine hydroxylase, *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1441**: 85-92.

Garrow TA, Brenner AA, Whitehead VM, Chen XN, Duncan RG, Korenberg JR, Shane B, 1993, Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization, *The Journal of Biological Chemistry*, **268**: 11910-11916.

Gerbling H, Gerhardt B, 1988, Carnitine-acyltransferase activity of mitochondria from mung-bean hypocotyls, *Planta*, **174**: 90-93.

Ghars MA, Parre E, Debez A, Bordenave M, Richard L, Leport L, Bouchereau A, Savouré A, Abdelly C, 2008, Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K+/Na+ selectivity and proline accumulation, *Journal of Plant Physiology*, **165**: 588-599.

Girgis S, Nasrallah IM, Suh JR, Oppenheim E, Zanetti KA, Mastri MG, Stover PJ, 1998, Molecular cloning, characterization and alternative splicing of the human cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase gene, *Gene*, **210**: 315-324.

Gooding JM, Shayeghi M, Saggerson ED, 2004, Membrane transport of fatty acylcarnitine and free L-carnitine by rat liver microsomes, *European Journal of Biochemistry*, **271**: 954-961.

Gülçin I, 2006, Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine, *Life Sciences*, **78**: 803-811.

Gulewitsch W, Krimberg R, 1905, Zur Kenntnis der Extractivstoffe der Muskeln, *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **45**: 326-328.

Gutierrez L, Mongelard G, Flokova K, Pacurar DI, Staswick P, Kowalczyk M, Demailly H, Geiss G, Bellini C, 2012, Auxin controls Arabidopsis adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis, *The Plant Cell*, **24**: 2515-2527.

H

Henderson LM, Hulse JD, Henderson LL, 1980, Purification of the enzymes involved in the conversion of trimethyl-lysine to trimethylaminobutyrate, *Carnitine Biosynthesis, Metabolism and Functions*, 35-43.

Henderson LM, Nelson PJ, Henderson L, 1982, Mammalian enzymes of trimethyllysine conversion to trimethylaminobutyrate, *Federation proceedings*, **41**: 2843-2847.

Hettema EH, Tabak HF, 2000, Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane, *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1486**: 18-27.

Hulse JD, Ellis SR, Henderson LM, 1978, Carnitine biosynthesis. β-hydroxylation of trimethyllysine by an α-ketoglutarate-dependent mitochondrial dioxygenase, *Journal of Biological Chemistry*, **253**: 1654-1659.

Hulse JD, Henderson LM, 1979, Isolation and characterization of an aldehyde dehydrogenase exhibiting preference for 4-*N*-trimethylaminobutyraldehyde as substrate, *Federation of American Societies for Experimental Biology*, **38**: 676.

Hulse JD, Henderson LM, 1980, Carnitine biosynthesis. Purification of 4-*N*-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase from beef liver, *The Journal of Biological Chemistry*, **255**: 1146-1151.

I

Izaguirre G, Kikonyogo A, Pietruszko R, 1997, Tissue distribution of human aldehyde dehydrogenase E3 (ALDH9): comparison of enzyme activity with E3 protein and mRNA distribution, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **118**: 59-64.

J

Jamai A, Salomé PA, Schilling SH, Weber APM, McClung CR, 2009, Arabidopsis photorespiratory serine hydroxymethyltransferase activity requires the mitochondrial accumulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase, *The Plant Cell*, **21**: 595-606.

Jander G, Norris SR, Joshi V, Fraga M, Rugg A, Yu S, LI L, Last RL, 2004, Application of a high-throughput HPLC-MS/MS assay to Arabidopsis mutant screening; evidence that threonine aldolase plays a role in seed nutritional quality, *The Plant Journal*, **39**: 465-475.

Jogl G, Hsiao YS, Tong L, 2005, Crystal structure of mouse carnitine octanoyltransferase and molecular determinants of substrate selectivity, *The Journal of Biological Chemistry*, **280**: 738-744.

Joshi V, Laubengayer KM, Schauer N, Fernie AR, Jander G, 2006, Two Arabidopsis threonine aldolases are nonredundant and compete with threonine deaminase for a common substrate pool, *The Plant Cell*, **18**: 3564-3575.

Hsiao YS, Jogl G, Esser V, Tong Liang, 2006[1], Crystal structure of rat carnitine palmitoyltransferase II (CPT-II), *Biochemical and biophysical research communications*, **346**: 974-980.

Hsiao YS, Jogl G, Tong L, 2006[2], Crystal structures of murine carnitine acetyltransferase in ternary complexes with its substrates, *Journal of Biological Chemistry*, **281**: 28480-28487.

K

Kalaiselvi T, Panneerselvam C, 1998, Effect of L-carnitine on the status of lipid peroxidation and antioxidants in aging rats, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **9**: 575-581.

Karimi M, Inzé D, Depicker A, 2002, Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation, *Trends Plant Science*, **7**: 193-195.

Kaufman RA, Broquist HP, 1977, Biosynthesis of carnitine in *Neurospora crassa*, *The Journal of Biological Chemistry*, **252**: 7437-7439.

Kemp S, Theodoulou FL, Wanders RJ, 2011, Mammalian peroxisomal ABC transporters: from endogenous substrates to pathology and clinical significance, *British journal of pharmacology*, **164**: 1753-1766.

Kerner J, **Hoppel C**, 2000, Fatty acid import into mitochondria, *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1486**: 1-17.

Kikonyogo A, Pietruszko R, 1996, Aldehyde dehydrogenase from adult human brain that dehydrogenates γ-aminobutyraldehyde: purification, characterization, cloning and distribution, *The Biochemical Journal*, **316**: 317-324.

Kirch HH, Bartels D, Wei Y, Schnable PS,Wood AJ, 2004, The ALDH gene superfamily of Arabidopsis, *Trends in plant science*, **9**: 371-377.

Kirch HH, Schlingensiepen S, Kotchoni S, Sunkar R, Bartels D, 2005, Detailed expression analysis of selected genes of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in *Arabidopsis thaliana*, *Plant molecular biology*, **57**: 315-332.

Kopecny D, Koncitikova R, Tylichova M, Vigouroux A, Moskalíkova H, Soural M, Sebela M, Moréra S, 2013, Plant ALDH10 family: identifying critical residues for substrate specifity and trapping a thiohemiacetal intermediate, *Journal of Biological Chemistry*, **288**: 9491-9507.

Kutscher F, 1905, Zur Kenntnis des Novains, *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **49**: 47-49.

L

Lawand S, Dirne AJ, Long D, Coupland G, Mache R, Carol P, 2002, Arabidopsis A BOUT DE SOUFFLE, which is homologous with mammalian carnitine acyl carrier, is required for postembryonic growth in the light, *Plant Cell*, **14**: 2161-73.

Lelandais-Brière C, **Jovanovic M**, **Torres GA**, **Perrin Y**, **Lemoine R**, **Corre-Menguy F**, **Hartmann C**, 2007, Disruption of AtOCT1, an organic cation transporter gene, affects root development and carnitine-related responses in Arabidopsis, *Plant Journal*, **51**: 154-164.

Li-Beisson, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, *et al*., 2013, Acyl-Lipid Metabolism, *Arabidopsis Book*, **11**: e0160.

Lindstedt G, Lindstedt S, 1970, Cofactor requirements of γ-butyrobetaine hydroxylase from rat liver, *The Journal of Biological Chemistry*, **245**: 4178-4186.

Lindstedt G, Lindstedt S, Tofft M, 1970, Gamma-butyrobetaine hydroxylase from Pseudomonas sp AK1, *Biochemistry*, **9**: 4336-4342.

Lin SW, Chen JC, Hsu LC, Hsieh CL, Yoshida A, 1996, Human γ-aminobutyraldehyde dehydrogenase (ALDH9): cDNA sequence, genomic organization, polymorphism, chromosomal localization, and tissue expression, *Genomics*, **34**: 376-380.

Louvet R, Cavel E, Gutierrez L, Guénin S, Roger D, Gillet F, Guerineau F, Pelloux J, 2006, Comprehensive expression profiling of the pectin methylesterase gene family during silique development in *Arabidopsis thaliana*, *Planta*, **224**: 782-791.

M

Manoli I, **De Martino MU**, **Kino T**, **Alesci S**, 2004, Modulatory effects of L-carnitine on glucocorticoid receptor activity, *Annals of the New York Academy Sciences*, **1033**: 147-157.

Masterson C, Wood C, Thomas DR, 1990, L-acetylcarnitine, a substrate for fatty acid synthesis, *Plant Cell Environ*, **13**: 767-71.

Masterson C, Wood C, 2000[1], Pea chloroplast carnitine acetyltransferase, *Proceedings of The Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, **267**: 1-6.

Masterson C, Wood C, 2000[2], Carnitine palmitoyltransferases in pea leaf chloroplasts: partial purification, location, and properties, *Canadian Journal of Botany*, **78**: 328-335.

Masterson C, Wood C, 2000[3], Mitochondrial β-oxidation of fatty acids in higher plants, *Physiologia Plantarum*, **109**: 217-224.

Masterson C, Wood C, 2000[4], Contribution of mitochondria and peroxisomes to palmitate oxidation in pea tissues, *Biochemical Society Transactions*, **28**: 757-60.

Masterson C, Wood C, 2009, Influence of mitochondrial β-oxidation on early pea seedling development, *New Phytologist*, **181**: 832-842.

McGarry JD, 1990, Inter-tissue and inter-species characteristics of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system, *Journal of Biological Chemistry*, **265**: 10714-10719.

McGarry JD, **Brown NF**, 1997, The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis, *Europen Journal of Biochemistry*, **244**: 1-14.

McLaren I, Wood C, Jalil MNH, Yong BCS, Thomas DR, 1985, Carnitine acyltransferases in chloroplasts of *Pisum sativum* L., *Planta*, **163**: 197-200.

McNeil PH, Thomas DR, 1975, Carnitine content of pea seedling cotyledons, *Phytochemistry*, **14**: 2335-2336.

Moellering ER, Benning C, 2011, Galactoglycerolipid metabolism under stress: a time for remodeling, *Trends in Plant Science*, **16**: 98-107.

Moreno JI, Martin R, Castresana C, 2005, Arabidopsis SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress, *The Plant Journal*, **41**: 451-463.

Miernyk JA, **Trelease RN**, 1981, Control of enzyme activities in cotton cotyledons during maturation and germination: IV. β-OXIDATION, *Plant Physiology*, **67**: 341-346.

Missihoun TD, Schmitz J, Klug R, Kirch HH, Bartels D, 2011, Betaine aldehyde dehydrogenase genes from Arabidopsis with different sub-cellular localization affect stress responses, *Planta*, **233**: 369-382.

Miyazawa S, **Ozasa H**, **Osumi T**, **Hashimoto T**, 1983, Purification and properties of carnitine octanoyltransferase and carnitine palmitoyltransferase from rat liver, *Journal of Biochemistry*, **94**: 529-542.

Murashige T, Skoog F, 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia plantarum*, **15**: 473-497.

N

Nair RB, Bastress KL, Ruegger MO, Denault JW, Chapple C, 2004, The *Arabidopsis thaliana REDUCED EPIDERMAL FLUORESCENCE1* gene encodes an aldehyde dehydrogenase involved in ferulic acid and sinapic acid biosynthesis, *Plant Cell*, **16**: 544-554.

Nebbioso M, Evangelista M, Librando A, Plateroti AM, Pescosolido N, 2013, Iatrogenic dry eye disease: An eledoisin/carnitine and osmolyte drops study, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **67**: 659-663.

O

Olson AL, Rebouche CJ, 1987, γ-Butyrobetaine hydroxylase activity is not rate limiting for carnitine biosynthesis in the human infant, *The Journal of Nutrition*, **117**: 1024-1031.

Ossowski S, Schwab R, Weigel D, 2008, Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs, *The Plant Journal*, **53**: 674-690.

Owen M, Corstorphine CC, Zammit VA, 1997, Overt and latent activities of diacylglycerol acytransferase in rat liver microsomes: Possible roles in very-low-density lipoprotein triacylglycerol secretion, *Biochemical Journal*, **323**: 17-21.

Owen M, **Zammit VA**, 1997, Evidence for overt and latent forms of DGAT in rat liver microsomes. Implications for the pathways of triacylglycerol incorporation into VLDL, *Biochemical Society Transaction*, **25**: 21S.

P

Paik WK, Kim S, 1971, Protein methylation, *Science*, **174**: 114-119.

Panter RA, Mudd JB, 1969, Carnitine levels in some higher plants, *FEBS Letters*, **5**: 169-170.

Panter RA, Mudd JB, 1973, Some aspects of carnitine metabolism in avocado (*Persea americana*), *Biochemical Journal*, **134**: 655-658.

Peluso G, Barbarisi A, Savica V, Reda E, Nicolai R, Benatti P, Calvani M, 2000, Carnitine: an osmolyte that plays a metabolic role, *Journal of cellular biochemistry*, **80**: 1-10.

R

Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR, 2001, Molecular enzymology of carnitine transfer and transport, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1546**: 21-43.

Ramsay RR, **Zammit VA**, 2004, Carnitine acyltransferases and their influence on CoA pools in health and disease, *Molecular Aspects of Medicine*, **25**: 475-493.

Ramon AM, Fonzi WA, 2003, Diverged binding specificity of Rim101p, the *Candida albicans* ortholog of PacC, *Eukaryotic Cell*, **2**: 718-728.

Rani PJA, Panneerselvam C, 2001, Carnitine as a free radical scavenger in aging, *Experimental Gerontology*, **36**: 1713-1726.

Rathinasabapathi B, Burnet M, Russell BL, Gage DA, Liao PC, Nye GJ, Scott P, Golbeck JH, Hanson AD, 1997, Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: Prosthetic group characterization and cDNA cloning, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**: 3454-3458.

Rawsthorne S, 2002, Carbon flux and fatty acid synthesis in plants, *Progress in Lipid Research*, **41**: 182-96.

Rebouche CJ, Engel AG, 1980, Tissue distribution of carnitine biosynthetic enzymes in man, *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, **630**: 22-29.

Rebouche CJ, Chenard CA, 1991, Metabolic fate of dietary carnitine in human adults: identification and quantification of urinary and fecal metabolites, *The Journal of Nutrition*, **121**: 539-546.

Rebouche CJ, 1992, Carnitine function and requirements during the life cycle, *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **6**: 3379-3386.

Rebouche CJ, Seim H, 1998, Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals, *Annual review of nutrition*, **18**: 39-61.

Rinaldo P, Raymond K, Al-Odaib A, Bennett MJ, 1998, Clinical and biochemical features of fatty acid oxidation disorders, *Current Opinion in Pediatrics*, **10**: 615-621.

Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ, 2002, Fatty acid oxidation disorders, *Annual review of physiology*, **64**: 477-502.

Rippa S, Zhao YJ, Merlier F, Charrier A, Perrin Y, 2012, The carnitine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana* shares similar features with the pathway of mammals and fungi, *Plant Physiology and Biochemistry*, **60**: 109-114.

Robinson SJ, Tang LH, Mooney BA, McKay SJ, Clarke WE, Links MG, Karcz S, Regan S, Wu YY, Gruber MY, Cui D, Yu M, Parkin IA, 2009, An archived activation tagged population of Arabidopsis thaliana to facilitate forward genetics approaches, *BMC Plant Biology*, **9**:101-116.

Roughan G, Post-Beittenmiller D, Ohlrogge J, Browse J, 1993, Is acetylcarnitine a substrate

for fatty acid synthesis in plants, *Plant Physiology*, **101**: 1157-62.

Rudman D, **Sewell CW**, **Ansley JD**, 1977, Deficiency of carnitine in cachectic cirrhotic patients, *Journal of Clinical Investigation*, **60**: 716-723.

S

Sachan DS, Hoppel CL, 1980, Carnitine biosynthesis. Hydroxylation of *N*-6-trimethyl-lysine to 3-hydroxy-*N* 6-trimethyl-lysine, *Biochemical Journal*, **188**: 529-534.

Scaglia F, Longo N, 1999, Primary and secondary alterations of neonatal carnitine metabolism, *Seminars in perinatology*, **23**: 152-161.

Schulz H, 1991, Beta oxidation of fatty acids, *Biochimca et Biophysca Acta (BBA)*, **1081**: 109-120.

Schwabedissen-Gerbling H, Gerhardt B, 1995, Purification and characterization of carnitine acyltransferase from higher plant mitochondria, *Phytochemistry*, **39**: 39-43.

Schwab R, Ossowski S, Warthmann N, Weigel D, 2010, Directed gene silencing with artificial microRNAs, *Plant MicroRNAs-Methods in Molecule Biology*, **592**: 71-88.

Smiddy M, Sleator RD, Patterson MF, Hill C, Kelly AL, 2004, Role for Compatible Solutes Glycine Betaine and L-Carnitine in Listerial Barotolerance, *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 7555-7557.

Sobiesiak-Mirska J, **Nałecz KA**, 2006, Palmitoylcarnitine modulates interaction between protein kinase C betaII and its receptor RACK1, *FEBS Journal*, **273**: 1300-1311.

Spaniol M, Brooks H, Auer L, Zimmermann A, Solioz M, Stieger B, Krähenbühl S, 2001, Development and characterization of an animal model of carnitine deficiency, *European Journal of Biochemistry*, **268**: 1876-1887.

Steiber A, Kerner J, Hoppel CL, 2004, Carnitine: A nutritional, biosynthetic, and functional perspective, *Molecular Aspects of Medicine*, **25**: 455-473.

Stein R, Englard S, 1982, Properties of rat 6-N-trimethyl-L-lysine hydroxylases: similarities among the kidney, liver, heart, and skeletal muscle activities, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **217**: 324-331.

Stephens FB, **Constantin-Teodosiu D**, **Greenhaff PL**, 2007, New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle, *The Journal of Physiology*, **581**: 431-44.

Stiti N, Adewale I, Petersen J, Bartels D, Kirch HH, 2011, Engineering the nucleotide coenzyme specificity and sulfhydryl redox sensitivity of two stress-responsive aldehyde dehydrogenase isoenzymes of Arabidopsis thaliana, *Biochemical Journal*, **434**: 459-471.

Strijbis K, van Roermund CW, Visser WF, Mol EC, van den Burg J, MacCallum DM, Odds FC, Paramonova E, Krom BP, Distel B, 2008, Carnitine-dependent transport

of acetyl coenzyme A in *Candida albicans* is essential for growth on nonfermentable carbon sources and contributes to biofilm formation, *Eukaryot Cell*, **7**: 610-618.

Strijbis K, van Roermund CWT, Hardy GP, van den Burg J, Bloem K, de Haan J, van Vlies N, Wanders RJA, Vaz FM et Distel B, 2009, Identification and characterization of a complete carnitine biosynthesis pathway in *Candida albicans*, *The FASEB Journal*, **23**: 2349-2359.

Strijbis K, Vaz FM, Distel B, 2010, Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway, *IUBMB life*, **62**: 357-362.

Swiegers JH, Dippenaar N, Pretorius IS, Bauer FF, 2001, Carnitine-dependent metabolic activities in *Saccharomyces cerevisiae:* three carnitine acetyltransferases are essential in a carnitine-dependent strain, *Yeast*, **18**: 585-595.

T

Tamai I, **Ohashi R**, **Nezu JI**, **Sai Y**, **Kobayashi D**, **Oku A**, **Shimane M**, **Tsuji A**, 2000, Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice, *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 40064-40072.

Tamai I, **Ohashi R**, **Nezu JI**, **Yabuuchi H**, **Oku A**, **Shimane M**, **Sai Y**, **Tsuji A**, 1998, Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2, *Journal of Biological Chemistry*, **273**: 20378-20382.

Tanphaichitr V, Broquist HP, 1974, Site of carnitine biosynthesis in the rat, *The Journal of Nutrition*, **104**: 1669-1673.

Tars K, Rumnieks J, Zeltins A, Kazaks A, Kotelovica S, Leonciks A, Sharipo J, Viksna A, Kuka J, Liepinsh E, Dambrova M, 2010, Crystal structure of human gamma-butyrobetaine hydroxylase, *Biochemical and biophysical research communications*, **398**: 634-639.

Tein I, Bukovac SW, Xie ZW, 1996, Characterization of the human plasmalemmal carnitine transporter in cultured skin fibroblasts, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **329**: 145-155.

Theodoulou FL, **Holdsworth M**, **Baker A**, 2006, Peroxisomal ABC transporters, *FEBS Letters*, **580**: 1139-1155.

Thomas DR, McNeil PH, 1976, The effect of carnitine on the oxidation of saturated fatty acids by pea cotyledon mitochondria, *Planta*, **132:** 61-63.

Thomas DR, Ariffin A, Jalil MNH, Yong BCS, Cooke RJ, Wood C, 1981, Effect of carnitine on greening barley leaves, *Phytochemistry*, **20**: 1241-44.

Thomas DR, Jalil MNH, Ariffin A, Cooke RJ, MacLaren I, Yong BCS, Wood C, 1983, The synthesis of short- and long-chain acylcarnitine by etio-chloroplasts of greening barley leaves, *Planta*, **158**: 259-263.

Thomas DR, Wood C, 1986, The two β-oxidation sites in pea cotyledons. Carnitine palmitoyltransferase: location and function in pea mitochondria, *Planta*, **168**: 261-66.

Tomita M, Sendju Y, 1927, Über die Oxyaminverbindungen welche die Biuret Reaktionen zeigen. III. Spaltung der γ-amino-β-oxybuttersäure in die optisch-aktiven Komponente, *Zeitschrift für Physiologische Chemie*, **169**: 263-277.

Tylichova M, Kopecny D, Moréra S, Briozzo P, Lenobel R, Snégaroff J, Sebela M, 2010, Structural and Functional Characterization of Plant Aminoaldehyde Dehydrogenase from Pisum sativum with a Broad Specificity for Natural and Synthetic Aminoaldehydes, *Journal of molecular biology*, **396**: 870-882.

V

van Roermund CW, Elgersma Y, Singh N, Wanders RJ, Tabak HF, 1995, The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cervisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions, *The EMBO Journal*, **14**: 3480-3486.

van Roermund CW, Hettama EH, van den Berg M, Tabak HF, Wanders RJ, 1999, Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetyl-CoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p, *The EMBO Journal*, **18**: 5843-5852.

Vaz, FM, Fouchier SW, Ofman R, Sommer M, Wanders RJ, 2000, Molecular and biochemical characterization of rat γ-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis, *The Journal of Biological Chemistry*, **275**: 7390-7394.

Vaz FM, Ofman R, Westinga K, Back JW, Wanders RJ, 2001, Molecular and biochemical characterization of rat ε-*N*-trimethyllysine hydroxylase, the first enzyme of carnitine biosynthesis, *The Journal of Biological Chemistry*, **276**: 33512-33517.

Vaz FM, van Gool S, Ofman R, IJlst L, Wanders RJ, 1999, Carnitine biosynthesis. Purification of γ-butyrobetaine hydroxylase from rat liver, *Advances in Expermental Medicine and Biology*, **466**: 117-124.

Vaz FM, van Gool S, Ofman R, IJlst L, Wanders RJ, 1998, Carnitine biosynthesis: identification of the cDNA encoding human γ-butyrobetaine hydroxylase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **250**: 506-510.

Vaz FM, Wanders RJ, 2002, Carnitine biosynthesis in mammals, *Biochemical Journal*, **361**: 417-429.

Verbruggen N, Hermans C, 2008, Proline accumulation in plants: a review, *Amino Acids*, **35**: 753-759.

Volek JS, Kraemer WJ, Rubin MR, Gómez AL, Ratamess NA, Gaynor P, 2002, L-Carnitine L-tartrate supplementation favorably affects markers of recovery from exercise stress, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **282**, E474-E482.

Voll LM, Jamai A, Renné P, Voll H, McClung R, Weber APM, 2006, The photorespiratory Arabidopsis *shm1* mutant is deficient in SHM1, *Plant Physiology*, **140**: 59-66.

W

Walther A, Wendland J, 2003, An improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*, *Current genetics*, **42**: 339-343.

Wanders RJA, **Vreken P**, **Ferdinandusse S**, **Jansen GA**, **Waterham HR**, **van Roermund CWT, Van Grunsven EG**, 2001, Peroxisomal fatty acid *a*- and *β*-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases, *Biochemical Society Transactions*, **29**: 250-267.

Wang Y, Kelly MA, Cowan TM, Longo N, 2000, A missense mutation in the OCTN2 gene associated with residual carnitine transport activity, *Human mutation*, **15**: 238-245.

Wang X, Wang ZH, Wu YY, Tang H, Tan L, Wang X, Gao XY, Xiong YS, Liu D, Wang JZ, Zhu LQ, 2013, Melatonin attenuates scopolamine-induced memory/synaptic disorder by rescuing EPACs/miR-124/Egr1 pathway, *Molecular Neurobiology*, **47**: 373-381.

Wang Y, Ye J, Ganapathy V, Longo N, 1999, Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**: 2356-2360.

Warren CR, 2013, Quaternary ammonium compounds can be abundant in some soils and are taken up as intact molecules by plants, *New Phytologist*, **198**: 476-485.

Washington LT, Cook GA, Mansbach CM, 2003, Inhibition of carnitine palmitoyltransferase in the rat small intestine reduces export of triacylglycerol into the lymph, *Journal of lipid research*, **44**: 1395-1403.

Wei Y, Lin M, Oliver DJ, Schnable PS, 2009,The roles of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) in the PDH bypass of Arabidopsis, *BMC biochemistry*, **10**: 7.

Winter SC, 2003, Treatment of carnitine deficiency. *Journal of inherited metabolic disease*, **26**: 171-180.

Woeltje KF, **Esser V**, **Weis BC**, **Cox WF**, **Schroeder JG**, **Liao ST**, **Foster DW**, **Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR**, 2001, Molecular enzymology of carnitine transfer and transport, *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1546**: 21-43.

Wood C, **Jalil MNH, McLaren I, Yong BCS, Ariffin A, McNeil PH, Burgess N, Thomas**

DR, 1984, Carnitine long-chain acyltransferase and oxidation of palmitate, palmitoyl coenzyme A and palmitoylcarnitine in pea mitochondria preparations, *Planta*, **161**: 255-60.

Wood C, Masterson C, Thomas DR, 1992, The role of carnitine in plant cell metabolism, In *Seminar Series-Society for experimental Biology, Cambridge University Press, Plant Organelles*, **50**: 229.

Wood DW, Setubal JC, Kaul R, *et al*., 2001, The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58, *Science*, **294**: 2317-2323.

Z

Zhang Y, Sun K, Sandoval FJ, Santiago K, Roje S, 2010, One-carbon metabolism in plants: characterization of a plastid serine hydroxymethyltransferase, *Biochemical Journal*, **430**: 97-105.

Zhang JT, Zhu JQ, Zhu Q, Liu H, Gao XS, Zhang HX, 2009, Fatty acid desaturase-6 (Fad6) is required for salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Biochemical and Biophysical research communication*, **390**: 469-474.