



HAL
open science

Rôle des enzymes ALDH10 dans la voie de biosynthèse de la carnitine et la physiologie de la plante chez *Arabidopsis*

Florian Jacques

► To cite this version:

Florian Jacques. Rôle des enzymes ALDH10 dans la voie de biosynthèse de la carnitine et la physiologie de la plante chez *Arabidopsis*. Biotechnologies. Université de Technologie de Compiègne, 2019. Français. NNT : 2019COMP2487 . tel-03234451

HAL Id: tel-03234451

<https://theses.hal.science/tel-03234451>

Submitted on 25 May 2021

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 Florian JACQUES

Rôle des enzymes ALDH10 dans la voie de biosynthèse de la carnitine et la physiologie de la plante chez Arabidopsis

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



Soutenue le 3 juin 2019

Spécialité : Biotechnologie : Unité de recherche Génie
Enzymatique et Cellulaire - GEC (UMR-7025)

D2487



Région
Hauts-de-France



Thèse

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE

UMR CNRS 7025

Laboratoire Génie Enzymatique et Cellulaire

Spécialité : Biotechnologie

Par

Florian JACQUES

Rôle des enzymes ALDH10 dans la voie de biosynthèse de la
carnitine et la physiologie de la plante chez Arabidopsis

Soutenance le 3 juin 2019

Devant le jury composé de :

Solange MORERA, DR.	Institut de Biologie Intégrative de la Cellule, CNRS	Rapporteur
Thierry CHARDOT, DR.	Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA-AgroParisTech	Rapporteur
Séverine PLANCHAIS, Dr.	Sorbonne Université, iEES	Examineur
Bérangère BIHAN-AVALLE, Pr.	Université de Technologie de Compiègne	Présidente du jury
Yolande PERRIN, Pr.	Université de Technologie de Compiègne	Directrice de thèse
Sonia RIPPA, Dr.	Université de Technologie de Compiègne	Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier le DR. Solange Moréra, le DR. Thierry Chardot, le Dr. Séverine Planchais et le Pr. Bérangère Bihan-Avalle pour avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je remercie le Fonds Européen de développement économique et régional (FEDER) pour le cofinancement de ce travail de thèse.

Je remercie le Pr. Karsten Haupt, directeur du laboratoire Génie enzymatique et cellulaire de l'Université de Technologie de Compiègne, pour m'avoir accueilli au sein de ce laboratoire.

Bien évidemment, je remercie mes deux directrices de thèse, le Pr. Yolande Perrin et le Dr. Sonia Rippa, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse, pour le temps et l'énergie qu'elles ont consacré à la supervision de mon travail, leurs conseils scientifiques indispensables au déroulement du projet, et pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche.

Je remercie le personnel scientifique du laboratoire Génie Enzymatique et Cellulaire pour l'aide qu'ils m'ont apportée tout au long de cette thèse.

Je remercie en particulier Franck Merlier et Sébastien Acket pour leur aide précieuse concernant les analyses en spectrométrie de masse.

Je remercie également Yannick Rossez, Adrian Troncoso-Ponce, Mounir Belkouch et Noadya Monnier pour l'assistance qu'ils m'ont apportée dans la mise au point de diverses expériences, des analyses lipidiques aux extractions d'ARN en passant par la production de protéines recombinantes. Mention spéciale pour Yannick, qui a partagé son bureau avec moi durant ma première année de thèse, pour son humour, et pour m'avoir fait partager sa passion pour les mygales, et pour la science en général.

Je remercie aussi Mounir pour sa conversation toujours enrichissante, son intérêt pour mon projet, et pour son soutien sans faille.

Je remercie le Dr. David Kopečný, le Dr. Martina Kopečná et le Pr. Marek Šebela pour m'avoir accueilli durant un mois au sein du département de protéomique et de biochimie des protéines du centre de recherche de la région de Haná (Olomouc, République Tchèque), pour leur disponibilité et pour m'avoir formé aux analyses d'enzymologie. Je remercie

également le Dr. Radka Končítíková pour son aide précieuse concernant la mise au point des analyses d'activité enzymatique, et tous les autres membres du laboratoire, notamment les étudiants, pour avoir contribué à rendre ce séjour si enrichissant, scientifiquement et humainement.

Je remercie Stéphanie Guénin et Gaëlle Mongelard, du centre de ressources régional en biologie moléculaire (CRRBM, Université de Picardie Jules Verne, Amiens), pour m'avoir permis d'utiliser leurs installations pour réaliser mes RT-PCR quantitatives, et pour leur aide et leurs conseils.

Je remercie le Pr. Bernard Offmann, de l'Université de Nantes pour son encadrement et ses conseils concernant les analyses bioinformatiques.

Je remercie étudiants et les anciens étudiants du laboratoire pour les bons moments passés ensemble et pour leur implication dans la vie du laboratoire. Je remercie en particulier les étudiants et post-docs avec qui j'ai partagé mon bureau pour leur contact toujours enrichissant.

Je remercie le personnel administratif et technique du laboratoire, Pascal Boulnois, Valérie Santoni, Valélie Dufrene, Morgane Luppi, Carol Schembri, dont l'assistance a été précieuse tout au long de ce travail de thèse.

Je remercie mes amis de Compiègne ainsi que ma famille, pour leur soutien, les moments partagés et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes recherches.

Enfin, je voudrais remercier tous ceux qui auront pu contribuer, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Sommaire

Liste des abréviations	7
I. Introduction bibliographique	13
A. La carnitine	15
1. Données générales sur la carnitine	15
2. La carnitine chez les animaux et les micro-organismes	15
a. Détection de la carnitine chez les animaux et les micro-organismes	15
b. Rôle dans le métabolisme lipidique	16
c. Homéostasie de la carnitine	18
d. Intervention dans l'homéostasie de l'acyl(acétyl)-CoA.....	19
e. Intervention dans la modulation de l'activité des protéines	19
f. Rôle dans la détoxification	20
g. Protection contre le stress osmotique	20
h. Protection contre le stress oxydatif	21
3. La carnitine chez les plantes.....	21
a. Détection de la carnitine et des acylcarnitines chez les plantes.....	21
b. Détection d'activités carnitine acyl(acétyl)transférases chez les plantes.....	24
c. Rôles possibles de la carnitine dans le métabolisme lipidique chez les plantes.....	25
i. Trafic intracellulaire des acides gras	25
ii. Trafic peroxysomal (catabolisme)	26
iii. Trafic mitochondrial	26
iv. Trafic plastidial	26
v. Trafic microsomal.....	28
d. Transport de la carnitine chez les plantes.....	28
e. Rôles possibles de la carnitine dans le maintien de la fonction cellulaire	29
i. Protection contre le stress salin	29
ii. Protection contre le stress oxydatif	30
iii. Régulation hormonale.....	30
4. Biosynthèse de la carnitine	30
a. Biosynthèse de la carnitine chez les animaux et les levures.....	30
i. Hydroxylation de la TML.....	31
ii. Conversion de la HTML en TMABAL.....	32
iii. Oxydation du TMABAL.....	32
iv. Oxydation de la γ -butyrobétaïne en carnitine	33
b. Biosynthèse de la carnitine chez les plantes	33

i.	Recherche d'enzymes par analyses bioinformatiques	33
B.	Les enzymes ALDH10 chez les plantes	35
1.	La superfamille ALDH	35
a.	Familles d'ALDH à l'échelle du vivant.....	35
b.	Les ALDH chez les plantes.....	36
2.	Les ALDH10 végétales.....	38
a.	La diversité des ALDH10	38
b.	Histoire évolutive des ALDH10	40
c.	Localisation cellulaire des ALDH10.....	43
d.	Structure des ALDH10	44
i.	Domaines de la protéine	45
ii.	Site de fixation du coenzyme	45
iii.	Site de fixation du cation.....	46
iv.	Domaine catalytique	47
v.	Fonctionnement enzymatique	48
vi.	Relations entre structure et spécificité de substrat	48
e.	Implication des ALDH10 dans la physiologie de la plante	49
i.	Intervention dans la synthèse de glycine bêtaïne	49
ii.	Intervention dans le métabolisme du GABA	50
iii.	Implication dans la résistance au stress	52
iv.	Effets de l'expression transgéniques des <i>ALDH10</i> sur la résistance au stress	53
v.	Implication dans la germination.....	55
C.	Objectifs du travail de thèse.....	57
II.	Matériel et méthodes.....	59
A.	Matériel.....	59
1.	Bactéries	59
2.	Plasmides.....	59
3.	Plantes.....	60
4.	Amorces pour les PCR.....	61
B.	Techniques préparatoires.....	62
1.	Culture et conservation des bactéries.....	62
2.	Clonage des bactéries.....	62
a.	Purification des plasmides.....	62
b.	Amplification par PCR en vue de clonages	62
c.	Digestion et ligation.....	63
d.	Electrophorèse	63

e.	Transformation.....	63
3.	Culture des plantes et préparation du matériel végétal.....	64
a.	Culture <i>in vitro</i>	64
b.	Culture en serre.....	64
c.	Culture en conditions de stress salin.....	64
d.	Croisements.....	65
e.	Dessiccation.....	65
4.	Extractions d'acides nucléiques de plantes.....	65
a.	Extraction d'ADN génomique.....	65
b.	Extraction d'ARN totaux.....	65
5.	Amplifications par PCR.....	66
a.	Génotypage par PCR.....	66
b.	RT-PCR quantitative.....	66
6.	Extraction, quantification et purification de protéines.....	67
a.	Expression des protéines recombinantes.....	67
b.	Extraction et purification de protéines bactériennes.....	67
c.	Extraction de protéines végétales.....	67
d.	Identification des protéines.....	68
7.	Extraction du GABA, de la γ -butyrobétaine et de la carnitine.....	68
8.	Extraction d'acides gras et de lipides.....	69
C.	Techniques analytiques.....	69
1.	Génotypage par PCR.....	69
2.	Activités enzymatiques.....	70
3.	Quantification du GABA, de la γ -butyrobétaine et de la carnitine.....	71
4.	Analyse et quantification des acides gras et des lipides.....	71
5.	Quantification de l'amidon.....	72
6.	Quantification des protéines.....	72
III.	Résultats.....	73
A.	Analyse de la fonctionnalité des enzymes ALDH10A8 et ALDH10A9 d'Arabidopsis.....	73
1.	Etude des séquences des ALDH10 d'Arabidopsis.....	73
a.	Site de fixation du coenzyme.....	76
b.	Site de fixation du cation.....	77
c.	Peptide signal d'adressage peroxysomal.....	78
d.	Résidus conservés du site catalytique.....	78
e.	Résidus responsables de la spécificité de substrat.....	79
2.	Caractérisation <i>in vitro</i> de l'activité enzymatique des AtALDH10.....	80

a.	Diversité des substrats	80
b.	Courbes de saturation	81
c.	Détermination des paramètres enzymatiques.....	83
d.	Recherche du pH optimal	84
3.	Etude de l'expression des gènes <i>AtALDH10A8</i> et <i>AtALDH10A9</i> selon les organes.....	85
4.	Discussion et perspectives	86
a.	Fonctionnalité des ALDH10	87
i.	Activité sur l'APAL.....	87
ii.	Activité sur l'ABAL	88
iii.	Activité sur le TMABAL	88
iv.	Activité sur la BAL	89
v.	pH optimaux	89
b.	Implications potentielles des <i>AtALDH10</i> dans la physiologie de la plante.....	90
i.	Dégradation des polyamines et des acides aminés.....	90
ii.	Protection contre le stress osmotique	90
iii.	Synthèse de γ -butyrobétaïne	91
B.	Etude du rôle biologique des enzymes <i>AtALDH10A8</i> et <i>AtALDH10A9</i>	93
1.	Etude préliminaire des mutants <i>KO8-2</i> et <i>badh</i>	94
a.	Analyse de l'expression de <i>AtALDH10A9</i> chez le mutant <i>badh</i>	94
b.	Position du T-DNA chez le mutant <i>badh</i>	95
c.	Etude de l'expression des gènes <i>AtALDH10A8</i> et <i>AtALDH10A9</i> chez <i>KO8-2</i> et <i>badh</i>	96
2.	Etude du double mutant <i>KO8-2 badh</i>	97
a.	Obtention du double mutant <i>KO8-2 badh</i>	97
b.	Caractérisation de la morphologie de la plante adulte	98
c.	Etude de la résistance au stress salin	102
d.	Caractérisation du développement précoce	104
i.	Vitesse du développement précoce	105
ii.	Evolution de la masse de la plantule.....	107
e.	Analyse des acides gras et des lipides dans les graines et les plantules	109
i.	Dosage des acides gras totaux	109
ii.	Dosage de l'eicosénoate.....	116
iii.	Dosage de l'hexadécatriénoate.....	118
iv.	Analyse des lipides dans les plantules âgées de 4 jours.....	121
a.	Dosage de l'amidon dans les graines et les plantules	124
b.	Dosage des protéines dans les graines et les plantules	126
c.	Variation de la composition de la matière sèche au cours du développement précoce	126

d.	Mesure de l'activité des enzymes AtALDH10 dans les extraits protéiques	128
e.	Dosage du GABA, de la γ -butyrobétaïne et de la carnitine	129
i.	Dosage du GABA.....	130
ii.	Dosage de la γ -butyrobétaïne	131
iii.	Dosage de la carnitine	134
3.	Discussion et perspectives	136
a.	La morphologie et le développement précoce	136
b.	Rôle des ALDH10 dans le catabolisme des polyamines.....	139
c.	Rôle des AtALDH10 dans la voie de biosynthèse de la carnitine	140
i.	Rôle dans la production de γ -butyrobétaïne.....	140
ii.	Hypothèses concernant la biosynthèse de la carnitine.....	142
d.	Rôle des ALDH10 dans la protection contre le stress osmotique	143
e.	Rôle des ALDH10 dans la synthèse de GABA.....	144
f.	Rôles spécifiques des isoenzymes AtALDH10.....	145
C.	Recherche de nouvelles enzymes impliquées dans la biosynthèse et le métabolisme associé à la carnitine chez les plantes	147
1.	Recherche d'enzymes de la voie de biosynthèse de la carnitine chez les plantes.....	147
a.	Recherches de candidats par homologie de séquence	148
b.	Recherche de candidats par homologie structurale	149
c.	Etude bioinformatique de la protéine NP_188773.1	151
d.	Etude de l'activité de la protéine NP_188773.1.....	153
2.	Recherche de candidats CAT, COT et CPT chez les plantes.....	154
a.	Etude de la diversité de la famille des carnitine acyl(acétyl)transférases	155
b.	Recherche de candidats par homologie de séquence.....	157
c.	Recherche de candidats par homologie de structure	159
3.	Recherche de CACT potentielles chez les plantes.....	162
a.	Etude de la diversité des CACT.....	163
b.	Recherche de candidats CACT par homologie de séquence	163
c.	Recherche de candidats CACT par homologie de structure.....	166
4.	Discussion et perspectives	166
a.	Biosynthèse de la carnitine	166
b.	Enzymes impliquées dans le transport des acides gras et de l'acétate <i>via</i> la carnitine..	167
IV.	Conclusion générale et perspectives.....	171
	Références.....	177

Liste des abréviations

ABA : Acide abscissique

ABAL : 4-aminobutyraldéhyde

ABC : ATP-binding cassette intervention

abi : ABA insensitive

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AGP : Aminoacid general permease

ALDH : Aldéhyde déshydrogénase

AMADH : Aminoaldéhyde déshydrogénase

APAL : 3-aminopropionaldéhyde

APS : Ammonium persulfate

ARN : Acide ribonucléique

ARF : Auxine response factor

ATP : Adénosine triphosphate.

BADH : Bétaïne aldéhyde déshydrogénase

BAL : Bétaïne aldéhyde

BBD : Butyrobétaïne dioxygénase

BET : Bromure d'éthidium

BLAST : Basic local alignment search tool

BOU : A bout de souffle

BSA : Bovine serum albumine

C : Carbone

CACT : Carnitine acylcarnitine translocase

CAT, CACP : Carnitine acétyltransférase

CMO : Choline monooxygénase

CoA : Coenzyme A

CoASH : Coenzyme A réduit

COT : Carnitine octanoyltransférase

CPT : Carnitine palmitoyltransférase
CRC : Carnitine carrier
CT : Carnitine transporter
CTS : COMATOSE
DAG : Diacylglycérol
DMABAL : Diméthyl-4-aminobutyraldéhyde
DMSP : 3-diméthylsulfuropropionate
DMSPAL : 3-diméthylaminopropionaldéhyde
dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate
DO : Densité optique
DTNB : Acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque
E value : Expect value
EC : Enzyme commission number
EDTA : Acide éthylène-diamine-tétra acétique
et al. : et alii (et autres)
Fax : Fatty acid export
Fd: Ferrédoxine
For, fwd : Forward
FORSA: fold recognition using a structural alphabet
g : gravitation
G: Loi gamma
GABA : Acide γ -aminobutyrique
GABA-T : GABA transaminase
GAD : Glutamate décarboxylase
GAP : Growth associated protein
GBAL : 4-guanidinobutyraldéhyde
GC-FID : Gas chromatography-flame ionisation detection
GFP : Green fluorescent protein
GLY : Glycine biosynthetic protein
GPAL: 3-guanidinopropionaldéhyde

GRDP: Glycine rich-domain containing protein
GS-GOGAT : Glutamate synthase-glutamate 2-oxoglutarate aminotransférase
GUS : β -glucuronidase
HEPES : 4-(2-Hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique
HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance
HTML : 3-Hydroxy-6-*N*-triméthyllysine
HTMLA : 3-Hydroxy-6-*N*-triméthyllysine aldolase
I : Proportion de sites invariants
IPTG : Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kDa : kilodalton
LACS : Long-chain acyl-CoA synthetase
LB : Luria-Bertani
LC-MS/MS : Liquid chromatography tandem mass spectrometry
LG : Le et Gascuel
m : masse
ME : Méthode enzymatique
MF : Matière fraîche
MS : Matière Sèche
NAD(P) : Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
NASC : Nottingham Arabidopsis stock centre
NCBI : National center for biotechnology information
ND : Non déterminé
NQ : Non quantifié
OCT : Organic cation transporter
PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis
pb : paire de bases
PCR : Polymerisation chain reaction
PDB : Protein database
PLP : 5' Phosphate de pyroxidal
pop : *pollen-pistil-interaction*

QTOF : Quadrupôle/temps de vol
Rev : Reverse
RMN : Résonance magnétique nucléaire
RNAi : ARN interférence
RNase : Ribonucléase
ROS : Reactive oxygen species
rpm : rotation par minute
RT-PCR : Real time polymerase chain reaction
Rubisco : Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
SDS : Sodium dodécyl sulfate
SHMT : Sérine hydroxyméthyltransférase
SOC : Super optimal broth with catabolic repressor
SSAL : Semialdéhyde succinique
TAE : Tris-acétate EDTA
TAG : Triacylglycérol
TAIR: The Arabidopsis information resource
TB : Tenebrio bioassay
T-DNA : ADN de transfert
THA : Thréonine aldolase
THP : 3-(2,2,2-Triméthylhydrazine) propionate
TMABADH : *N-N-N*-triméthyl-4-aminobutyraldéhyde déshydrogénase
TMABAL : *N-N-N*-triméthyl-4-aminobutyraldéhyde
TMAPA : *N-N-N*-triméthyl-3-aminopropioniate
TMAPAL : *N-N-N*-triméthyl-3-aminopropionaldéhyde
TEMED: Tétraméthyléthylènediamine
TML : 6-*N*-Triméthyllysine
TMLD : 6-*N*-Triméthyllysine dioxygénase
Tris : Trishydroxyméthylaminométhane
U : Unité
UV : Ultraviolets

v : volume

YMC : Yeast mitochondrial carrier

Δ : Délétion d'un gène

I. Introduction bibliographique

Ce travail de thèse porte sur l'étude du **rôle des enzymes ALDH10 dans la biosynthèse de la carnitine et la physiologie de la plante chez Arabidopsis**.

Ce projet a été réalisé au sein du laboratoire génie enzymatique et cellulaire (unité mixte de recherches CNRS 7025), en lien avec le thème métabolisme végétal et bioressources développé par le laboratoire. L'un des axes majeurs de recherches développés dans ce thème porte sur l'étude du métabolisme lipidique chez les plantes oléagineuses, dont Arabidopsis. Ceci s'inscrit dans une volonté de valoriser à terme les huiles végétales pour l'industrie agroalimentaire et la chimie verte. L'amélioration des agroressources pour l'industrie et la production d'huiles végétales rend indispensable une meilleure compréhension du métabolisme oléagineux.

La carnitine est un acide aminé non protéinogène dont le rôle dans le métabolisme lipidique chez les animaux et les levures est bien documenté. Elle intervient dans le trafic intracellulaire des acides gras et de l'acétate (Bremer 1983; Steiber *et al.* 2004). Elle permet notamment le transport des acides gras vers la matrice mitochondriale, dans laquelle ils peuvent subir la β -oxydation. La carnitine joue également un rôle dans la protection contre le stress osmotique et le stress oxydatif (Peluso *et al.* 2000; Gómez-Amores *et al.* 2007).

Chez les plantes, la carnitine est présente mais son rôle précis demeure peu documenté. Notre laboratoire a mené des recherches pour approfondir les connaissances au sujet du rôle de la carnitine dans la physiologie de la plante. Ceci a permis d'identifier et de quantifier chez les plantes des esters d'acylcarnitines aux côtés de la carnitine libre (Bourdin *et al.* 2007; Nguyen *et al.* 2016), démontrant l'intervention de la carnitine dans le métabolisme lipidique chez les plantes, comme chez les animaux et les levures. Notre laboratoire a également montré que la carnitine exogène module l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress et à l'acide abscissique, et protège les plantes contre le stress salin et oxydatif (Charrier *et al.* 2012). Ces données montrent que la carnitine a des implications physiologiques similaires chez les plantes et les animaux.

L'élucidation du rôle de la carnitine chez les plantes nécessite l'identification et l'étude de mutants affectés dans leur capacité à synthétiser cette molécule. La voie de biosynthèse de la carnitine chez les animaux et les levures est bien caractérisée. La carnitine est synthétisée à partir de la triméthyllysine (TML) *via* quatre étapes, catalysées chacune par une enzyme qui est

caractérisée (Vaz and Wanders 2002; Strijbis *et al.* 2009). Notre laboratoire a montré que la voie de biosynthèse de la carnitine chez les plantes pourrait suivre les mêmes étapes que chez les animaux et les levures (Rippa *et al.* 2012). Une recherche par homologie de séquences a permis d'identifier les enzymes aldéhyde déshydrogénases 10 (ALDH10) comme étant potentiellement impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine (Rippa *et al.* 2012; Zhao 2014). Plusieurs fonctions biologiques ont été attribuées à cette famille d'enzymes, notamment la synthèse d'osmoprotectants tels que la glycine bêtaïne et le GABA. Des études suggèrent également que certaines ALDH10 végétales seraient capables de synthétiser *in vitro* de la γ -butyrobétaïne (Tylichová *et al.* 2010; Kopečný *et al.* 2013), le précurseur direct de la carnitine chez les animaux et les levures. Deux isoenzymes ALDH10 sont identifiées chez *Arabidopsis*, mais leur implication dans la biosynthèse de la carnitine n'a encore jamais été étudiée.

Ce travail de thèse a donc pour objectif d'étudier le rôle des AtALDH10 dans la voie de biosynthèse de la carnitine et dans d'autres processus physiologiques chez *Arabidopsis*. Tout d'abord, les enzymes recombinantes ont été produites et caractérisées *in vitro*. Ensuite, l'effet de leur perte de fonction a été étudié *in planta*. Enfin, une recherche exhaustive d'enzymes associées à la synthèse de carnitine ou à son activité de transport des acides gras et de l'acétate a été menée au moyen de recherches bioinformatiques approfondies. Cette étude a pour but d'approfondir les connaissances portant sur la voie de biosynthèse et la fonction de la carnitine chez les plantes, en tirant profit de ce qui est connu chez l'animal et la levure. Une caractérisation fonctionnelle des candidats identifiés a été initiée.

A. La carnitine

1. Données générales sur la carnitine

La carnitine, ou L-3-hydroxy-4-N-N-N-triméthylaminobutyrate (L-carnitine), de formule chimique $C_7H_{15}NO_3$, est un acide aminé non protéinogène appartenant au groupe des composés à ammonium quaternaire. Elle est aussi appelée vitamine B_T, car elle a été identifiée historiquement comme étant requise pour la croissance du ver de farine (*Tenebrio molitor*). La carnitine est identifiée chez tous les règnes vivants. Deux stéréoisomères existent : la D-carnitine et la L-carnitine. Seule cette dernière est biologiquement active (Harmeyer, 2002). La carnitine porte une fonction hydroxyle, qui peut intervenir dans la réaction d'estérification avec les acides gras ou l'acétate (Figure 1). Cette réaction est catalysée par les enzymes carnitine acétyl(acyl)transférases. Chez les animaux, le rôle le mieux caractérisé de la carnitine concerne le transport intracellulaire des acides gras et de l'acétate. Elle est également impliquée dans l'homéostasie cellulaire. Des fonctions similaires ont été décrites chez les plantes, mais le rôle précis de la carnitine dans le métabolisme végétal reste peu documenté.

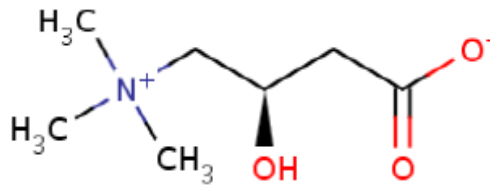


Figure 1 : Structure chimique de la carnitine

2. La carnitine chez les animaux et les micro-organismes

a. Détection de la carnitine chez les animaux et les micro-organismes

La carnitine (du Latin « carna » signifiant « chair ») a été découverte en 1905 dans des extraits de muscles squelettiques par deux équipes de chercheurs (Gulewitsch and Krimberg 1905; Kutscher 1905). Depuis, la carnitine a été identifiée chez tous les principaux groupes biologiques. Chez les animaux, elle a été détectée dans plusieurs organes : le foie, les muscles squelettiques, le cerveau, le cœur ou encore le rein (Nakano *et al.* 1989; van Vlies *et al.* 2005) (Tableau 1). Elle a également été quantifiée chez plusieurs espèces de champignons, tels que la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Fraenkel, 1953) et *Neurospora crassa* (Kaufman & Broquist, 1977).

Tableau 1 : Concentrations en carnitine dans quelques tissus animaux et chez les levures. La méthode de mesure est précisée. ME : méthode enzymatique, TB : test utilisant la larve de ténébrion, ou LC-MS/MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse. MF : masse fraîche.

	Espèce et tissu	Contenu en carnitine ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF)	Méthode de mesure
Animaux	Foie humain	120,9	ME
	Muscle squelettique humain	16,1	ME
	Cerveau humain	354,6	ME
	Foie de souris	$38,8 \pm 4,2$	LC-MS/MS
	Cœur de souris	$112,6 \pm 30,9$	LC-MS/MS
	Rein de souris	$64,4 \pm 5,8$	LC-MS/MS
	Muscle squelettique de souris	$35,6 \pm 6,0$	LC-MS/MS
	Cerveau de souris	$17,9 \pm 5,3$	LC-MS/MS
Champignons	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Jusqu'à 35	TB
	<i>Neurospora crassa</i>	28	TB

b. Rôle dans le métabolisme lipidique

Chez les animaux et les levures, la carnitine joue un rôle fondamental dans le métabolisme lipidique. Son activité implique les enzymes carnitine acyl(acétyl)transférases, en charge de l'estérification de la carnitine avec les acides gras ou l'acétate en acyl(acétyl)carnitine (Bremer 1983). Les carnitine acyl(acétyl)transférases sont réparties en quatre catégories selon leur spécificité de substrat (Ramsay *et al.* 2001). Les carnitine acétyltransférases (CAT ; EC 2.3.1.7) sont spécifiques des acyl-CoA aux chaînes carbonées les plus courtes (C2:0 à C4:0). Les carnitine octanoyltransférases (COT ; EC 2.3.1.137) estérifient les acyl-CoA à chaîne moyenne (C6:0 à C10:0). Les carnitine palmitoyltransférases (CPT ; EC 2.3.1.21) sont spécifiques des acides gras à chaîne longue (C12 :0 à C18 :0).

Chez les animaux, la CAT est présente dans de nombreux tissus. Elle a été identifiée dans le peroxyosome, la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (Markwell *et al.* 1973) (Tableau 2). La COT est, elle aussi, identifiée dans le peroxyosome (Choi *et al.* 1995; Cronin 1997; Ferdinandusse *et al.* 1999), la mitochondrie (Clarke & Bieber, 1981) et le réticulum endoplasmique (Markwell *et al.* 1973). Deux catégories de CPT existent : la CPT1 et la CPT2, présentes sur la membrane externe et la membrane interne mitochondriales, respectivement (Tableau 2). Chez les animaux, trois isoformes de CPT1 sont décrites. La CPT1A est identifiée dans tous les tissus, mais particulièrement exprimée au niveau du foie et du rein. La CPT1B est spécifiquement présente au niveau des muscles squelettiques et du cœur. Enfin, la CPT1C est

spécifique du cerveau (Zammit *et al.* 2009). Une activité CPT a également été détectée dans le peroxyosome (Derrick and Ramsay 1989), au niveau de la membrane plasmique des érythrocytes (Ramsay *et al.* 1991), et dans le réticulum endoplasmique (Murthy and Pande 1994; Sierra *et al.* 2008) (Tableau 2). Chez la levure *S. cerevisiae*, un même gène code une CAT qui peut être adressée au peroxyosome ou à la membrane interne mitochondriale (Elgersma *et al.* 1995). Une autre CAT est présente sur la membrane externe de la mitochondrie (Schmalix and Bandlow 1993). Elle est homologue à une CAT cytosolique de *Aspergillus nidulans* (Stemple *et al.* 1998). Une activité COT et une activité CPT ont été détectées au niveau des mitochondries et des peroxyosomes, respectivement (Pagot and Belin 1996).

Tableau 2 : Localisations subcellulaires des carnitine acyl(acétyl)transférases chez les animaux et les levures. Abréviations : CAT : carnitine acétyltransférase. COT : carnitine octanoyltransférase. CPT : carnitine palmitoyltransférase.

	Organite cellulaire	Activités carnitine acyl(acétyl)transférases	Références
Animaux	Peroxyosome	CAT ; COT ; CPT	Markwell et al. 1973 Choi et al. 1995 Derrick & Ramsay, 1989
	Mitochondrie	CAT ; COT ; CPT1 ; CPT2	Markwell et al. 1973 Clarke et Bieber, 1981
	Réticulum endoplasmique	CAT ; COT ; CPT	Markwell et al. 1973
	Membrane plasmique	CPT	Ramsay et al. 1991
Levures	Peroxyosome	CAT; CPT	Pagot & Belin, 1996
	Mitochondrie	CAT ; COT	Elgersma et al. 1995 Pagot & Belin, 1996

En plus des carnitine acyl(acétyl)transférases, les carnitine acylcarnitine translocases (CACT), sont impliquées dans le trafic intracellulaire des acides gras et de l'acétate. Ces protéines sont des canaux antiporteurs capables de transporter simultanément la carnitine et l'acylcarnitine. Chez les animaux, une CACT est identifiée au niveau du peroxyosome et de la mitochondrie (Fraser and Zammit 1999). Chez le rat, un autre type de transporteur carnitine/acylcarnitine a également été identifié sur les microsomes du foie. Il est moins spécifique que la CACT mitochondriale puisqu'il est capable de prendre en charge la carnitine, mais aussi d'autres acides aminés (Gooding *et al.* 2004; Tonazzi *et al.* 2006). Chez les levures, une CACT mitochondriale nommée carnitine carrier 1 (CRC1) est impliquée dans l'importation des acylcarnitines vers la matrice mitochondriale (Palmieri *et al.* 1999). Un homologue de la CACT mitochondriale humaine, aminoacid general permease 2 (AGP2) est situé sur la membrane plasmique (Van Roermund *et al.* 1999).

Chez les animaux et les levures, les carnitine acyl(acétyl)transférases et les CACT sont principalement impliquées dans le trafic intracellulaire des acides gras et de l'acétate. Chez les animaux, la fonction la mieux caractérisée est le système appelé « navette carnitine » (Figure 2). Il consiste à transporter les acides gras à longue chaîne vers la matrice mitochondriale, où a lieu la β -oxydation (Ramsay *et al.* 2001). Ce système implique les deux enzymes CPT1 et CPT2, ainsi qu'une CACT. La CPT1 catalyse l'estérification de la carnitine en acylcarnitine. L'acylcarnitine ainsi formée est ensuite transportée par la CACT vers la matrice mitochondriale, et la CPT2 reforme l'acyl-CoA dans la matrice. La CPT2 et la CACT forment un complexe (Console *et al.* 2014). La carnitine est ensuite exportée vers le cytoplasme et l'acyl-CoA peut alors subir la β -oxydation.

Chez les animaux, une autre β -oxydation a lieu dans le peroxyosome. Elle concerne l'oxydation partielle des acides gras à très longue chaîne en acides gras à chaîne moyenne. Ces derniers sont convertis en acylcarnitine *via* l'activité d'une COT peroxyosomale (Longo *et al.* 2016). Les acylcarnitines sont ensuite exportées vers la mitochondrie en vue de la β -oxydation (Farrell and Bieber 1983; Verhoeven *et al.* 1998). Une CACT peroxyosomale est vraisemblablement impliquée dans cette exportation (Fraser and Zammit 1999).

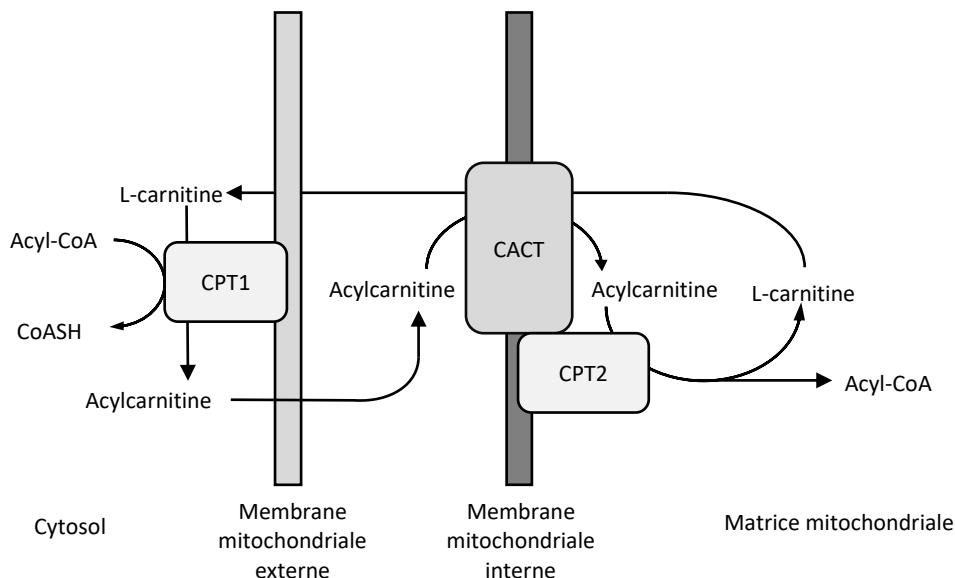


Figure 2 : Système de transport des acides gras à travers la membrane mitochondriale utilisant la carnitine. Abréviations : CPT1 : carnitine palmitoyltransférase 1 (membrane mitochondriale externe). CPT2 : carnitine palmitoyltransférase 2 (membrane mitochondriale interne). CACT : carnitine acylcarnitine translocase. CoA : coenzyme A.

c. Homéostasie de la carnitine

Chez les animaux, la carnitine circule à travers l'organisme par voie sanguine. Elle peut être ensuite transportée au travers des membranes plasmiques de différents tissus. Plusieurs

transporteurs membranaires ont été identifiés comme étant impliqués dans l'importation de la carnitine par les cellules. Chez l'homme et la souris, le transporteur organic cation transporter 2 (OCTN2) transporte la carnitine de manière Na^+ dépendante (Tamai *et al.* 2000), mais peut également transporter des acyl(acétyl)lcarnitines et la bétaine (Pochini *et al.* 2004). Il est fortement exprimé dans le rein, le placenta, le cœur et le muscle squelettique (Tamai *et al.* 2000). OCTN1, présent lui aussi dans des tissus variés, peut également transporter la carnitine de manière Na^+ dépendante. Le transporteur OCTN3 importe la carnitine sans utiliser le Na^+ (Tamai *et al.* 2000). Enfin, carnitine transporter 2 (CT2) est un transporteur de carnitine spécifique du rein et de la lignée hématopoïétique (Enomoto *et al.* 2002).

d. Intervention dans l'homéostasie de l'acyl(acétyl)-CoA

Chez les animaux, la carnitine intervient dans la régulation de l'équilibre acétyl-CoA/CoA dans la mitochondrie (Stephens *et al.* 2007). Ainsi, chez l'Homme, elle joue un rôle en cas de production importante d'acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (EC 1.2.4.1) lors d'un effort physique. Pour maintenir une concentration idéale en coenzyme A réduit (CoASH) disponible pour le cycle de Krebs ou la β -oxydation, les acétyles activés sont stockés sous forme d'acétylcarnitine. Une réduction importante de la quantité de carnitine libre dans le muscle est alors mesurée. L'acétylcarnitine est ensuite exportée de la mitochondrie pour constituer une réserve dans le cytosol, qui peut être de nouveau importée dans la matrice en vue du cycle de Krebs. De la même manière, le ratio acétyl-CoA/acétylcarnitine contrôle la disponibilité du coenzyme A, ce qui permet un fonctionnement optimal du muscle cardiaque (Constantin-Teodosiu *et al.* 1992). La réserve d'acylcarnitines permet aussi de fournir des acyl-CoA pour le renouvellement des lipides membranaires des érythrocytes par déacylcation et réacylation (Ramsay *et al.* 1991).

e. Intervention dans la modulation de l'activité des protéines

La carnitine libre et certains de ses esters jouent un rôle dans la modulation de l'activité de certaines protéines. Par exemple, le ratio carnitine libre/palmitoylcarnitine influence l'activité des caspases, une classe de protéases impliquée dans l'apoptose (Mutomba *et al.* 2000). La carnitine libre exogène inhibe l'activité des caspases 3, 7 et 8. A l'inverse, la palmitoylcarnitine stimule l'activité de ces caspases. L'apoptose s'accompagne d'une formation de palmitoylcarnitine, qui serait due à une augmentation de l'activité de la CPT1. De la même manière, la palmitoylcarnitine inhibe l'action de la protéine kinase C, qui intervient dans

diverses fonctions physiologiques. En particulier, elle l'empêche d'interagir avec son récepteur (Sobiesiak-Mirska and Nalecz 2006). La protéine growth associated protein-43 (GAP-43), impliquée dans le fonctionnement du système nerveux, est elle aussi régulée par la palmitoylcarnitine (Nalecz *et al.* 2007). La carnitine intervient également dans la signalisation. Chez les animaux, elle a une action agoniste sur le récepteur aux glucocorticoïdes (Manoli *et al.* 2004). Elle empêche aussi l'entrée de la thyroxine et de la triiodothyronine dans le noyau, et a donc un effet antagoniste à celui de l'hormone thyroïdienne (Benvenga *et al.* 2004).

f. Rôle dans la détoxification

Certaines molécules, utilisées notamment dans des médicaments, comme le pivalate (ou acide triméthylacétique), et le valproate (ou acide 2-propylpentanoïque), peuvent être éliminées grâce à la carnitine. Elles sont activées par le coenzyme A, puis sont converties en pivaloylcarnitine et en valproylcarnitine, respectivement, et sont éliminées sous cette forme par voie urinaire (Ohnishi *et al.* 2008).

g. Protection contre le stress osmotique

Chez les animaux et les micro-organismes, la carnitine intervient dans la protection contre le stress osmotique. Chez les bactéries, c'est par ailleurs le seul rôle décrit de la carnitine. Les organismes vivants peuvent accumuler des solutés compatibles pour se défendre contre le stress osmotique (Yancey 2005). Ce sont des molécules capables de s'accumuler à des concentrations élevées dans la cellule sans altérer les fonctions cellulaires. Ces composés peuvent être des sucres, des polyols ou bien des composés à ammonium quaternaire. En tant que composé à ammonium quaternaire, la carnitine possède des propriétés osmoprotectantes chez les bactéries et les animaux (Peluso *et al.* 2000; Angelidis and Smith 2003a, 2003b). Chez les bactéries, la carnitine protège la cellule contre le stress osmotique induit par le sel et par le froid. Chez *Escherichia coli*, le stress salin stimule la biotransformation de la crotonobétaïne en carnitine, permettant ainsi l'accumulation de la carnitine dans les cellules (Canovas *et al.* 2007). Chez *Listeria monocytogenes*, le froid stimule le transport de carnitine depuis le milieu extracellulaire vers le cytosol par le transporteur OpuC (Angelidis *et al.* 2002). Chez l'Homme, le transporteur OCTN2 est activable par le stress et permet l'accumulation de carnitine dans le lumen de l'épididyme (Cotton *et al.* 2010).

h. Protection contre le stress oxydatif

De nombreuses études ont montré que la carnitine et certains de ses esters possèdent des propriétés antioxydantes chez les animaux (Kalaiselvi and Panneerselvam 1998; Peluso *et al.* 2000; Sener *et al.* 2004; Gómez-Amores *et al.* 2007; Augustyniak and Skrzydlewska 2009) et les levures (Franken *et al.* 2008). La carnitine régule l'activité d'enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydatif, comme la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase (Calabrese *et al.* 2005; Gómez-Amores *et al.* 2007). Ainsi, l'effet protecteur de la carnitine exogène contre le stress oxydatif a été montré au niveau du système nerveux du rat (Silva-Adaya *et al.* 2008). La carnitine et la palmitoylcarnitine inhibent la peroxydation des lipides et détournent l'ion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (Gülçin 2006). La palmitoylcarnitine ainsi que la propionylcarnitine chélatent les ions fer, inhibant ainsi la réaction de Fenton (Reznick *et al.* 1992; Vanella *et al.* 2000; Gülçin 2006). La palmitoylcarnitine protège également l'ADN contre les dommages induits par les rayons ultraviolets (UV) et le stress oxydatif (Vanella *et al.* 2000). Toutefois, d'autres études ont montré que la consommation de carnitine peut également altérer la fonction du foie et du rein chez le rat, notamment en perturbant le métabolisme des lipides et le transport d'ions, et en induisant la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Liu *et al.* 2015).

3. La carnitine chez les plantes

a. Détection de la carnitine et des acylcarnitines chez les plantes

La présence de carnitine dans les tissus végétaux a été établie en 1951 (Fraenkel 1951a, 1951b). La méthode utilisée était basée sur le besoin de carnitine pour la croissance du ver de farine, *Tenebrio molitor*. Elle a permis de détecter la carnitine chez plusieurs espèces (Tableau 3), dont la noix de Coco (*Cocos nucifera*), le blé (*Triticum aestivum*), le maïs (*Zea mays*), ou l'avoine (*Avena sativa*). Une méthode enzymatique a ensuite été mise au point, d'abord sur les tissus animaux (Marquis & Fritz, 1964). Elle consiste à ajouter une CAT et de l'acétyl-CoA aux extraits biologiques. La CAT catalyse l'estérification de l'acétyl-CoA exogène et de la carnitine endogène en acétylcarnitine. Le CoASH produit par cette réaction est alors dosé par une méthode spectrophotométrique utilisant l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (DTNB). Cette méthode a permis de quantifier la carnitine dans des tissus de plusieurs espèces, dont le blé, l'orge, l'avoine, le mésocarpe d'avocat et l'inflorescence de chou-fleur (Panter and Mudd 1969) (Tableau 3). Cependant, avec cette méthode, la carnitine n'a pas pu être détectée dans certains

tissus tels que la graine de ricin (*Ricinus communis*), la feuille d'épinard (*Spinacia oleracea*) et de chou (*Brassica oleracea*). Avec cette méthode, les groupements SH endogènes conduisaient à une surestimation de la quantité de CoASH. Elle a donc été améliorée par l'utilisation de CoASH radiomarqué (Cederblad and Lindstedt 1972). Cette nouvelle méthode a permis de quantifier la carnitine dans les feuilles de pois (Mcneil and Thomas 1975) et d'orge (Ariffin *et al.* 1982) (Tableau 3).

Plus récemment, notre laboratoire a adapté une méthode utilisant la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS), mise au point pour doser la carnitine et ses esters dans les tissus animaux (Vernez *et al.* 2002). Cette méthode a permis de détecter et de quantifier dans des tissus végétaux la carnitine libre et, pour la première fois, les acylcarnitines de moyenne et longue chaîne dans les plantules d'Arabidopsis, du colza (*Brassica napus*), du lin (*Linum usitatissimum*) et du tabac (*Nicotiana tabacum*) (Bourdin *et al.* 2007). La carnitine est présente à des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g g}^{-1}$ de matière sèche et les acylcarnitines entre 17,5 et 37,8 ng g^{-1} de matière sèche (Tableau 3). Les acylcarnitines sont principalement constituées d'oléoylcarnitine, stéaroylcarnitine et palmitoylcarnitine, mais aussi des acylcarnitines à moyenne chaîne telles que l'octanoylcarnitine et la myristoylcarnitine. Chez les plantes, les teneurs en carnitine libre et en acylcarnitines (Bourdin *et al.* 2007) sont respectivement 100 et 1000 fois inférieures par rapport aux teneurs quantifiées dans les tissus animaux (van Vlies *et al.* 2005). Ce résultat pourrait être corrélé au métabolisme photoautotrophe des végétaux (Bourdin *et al.* 2007). La présence d'acylcarnitines chez les plantes démontre que la carnitine intervient dans le métabolisme lipidique chez les plantes, comme chez les animaux et les levures.

Tableau 3 : Concentration en carnitine et en acylcarnitines totales dans les tissus végétaux, en $\mu\text{g g}^{-1}$ MS, sauf mention contraire. Abréviations : ME : méthode enzymatique (Panter and Mudd 1969; Cederblad and Lindstedt 1972; Mcneil and Thomas 1975; Ariffin *et al.* 1982). TB : test utilisant la larve de ténébrion (Fraenkel 1951a, 1953). LC-MS/MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (Bourdin *et al.* 2007; Nguyen *et al.* 2016). MF : masse fraîche. MS : masse sèche. ND : non déterminé. NQ : non quantifié.

Espèce et organe	Contenu en carnitine ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS)	Contenu en acylcarnitine (ng g^{-1} MS)	Méthode de mesure
Noix de coco	NQ	ND	TB
Cacahuète	NQ	ND	TB
Graine de coton	NQ	ND	TB
Avoine	NQ	ND	TB
Seigle	NQ	ND	TB
Luzerne	NQ	ND	TB
Grain de maïs	<0,5 $\mu\text{g g}^{-1}$	ND	TB
Blé	7-14 $\mu\text{g g}^{-1}$	ND	TB
Grain de blé	4	ND	ME
Germe de blé	12	ND	ME
Graine d'avoine	1	ND	ME
Plantule d'avoine	14	ND	ME
Feuille d'épinard	0	ND	ME
Feuille de chou	0	ND	ME
Graine de ricin	0	ND	ME
Cacahuète	1	ND	ME
Inflorescence de chou-fleur	14	ND	ME
Mésocarpe d'avocat	48	ND	ME
Cotylédon de pois	1 MF	ND	ME
Haricot vert	8,1 MF	ND	ME
Pois	11,6 MF	ND	ME
Tomate	29,3 MF	ND	ME
Asperge	12,9 MF	ND	ME
Pêche	16,1 MF	ND	ME
Poire	27,4 MF	ND	ME
Ananas	10,5 MF	ND	ME
Pomme de terre	0 MF	ND	ME
Riz	17,7	ND	ME
Graine d'orge	0,13 MF	ND	ME
Feuille d'orge	0,58 MF	ND	ME
Plantule d'orge	0,15 MF	ND	ME
Colza	3,2 \pm 2,1	31,2 \pm 16,9	LC-MS/MS
Lin	5,1 \pm 3,1	37,8 \pm 15,1	LC-MS/MS
Tabac	2,7 \pm 1,7	27,1 \pm 12,8	LC-MS/MS
Racine d'Arabidopsis	5,4 \pm 1,6	28,8 \pm 7,7	LC-MS/MS
Rosette d'Arabidopsis	4,1 \pm 0,7	19,0 \pm 3,5	LC-MS/MS
Plantule d'Arabidopsis	1,2 \pm 0,2	17,5 \pm 1,9	LC-MS/MS

b. Détection d'activités carnitine acyl(acétyl)transférases chez les plantes

Chez les plantes, des activités carnitine acyl(acétyl)transférases ont été mesurées dans plusieurs organites (Tableau 4). Des activités CAT et CPT ont été mesurées au niveau du chloroplaste chez l'orge (Thomas *et al.* 1983) et le pois (McLaren *et al.* 1985; Masterson and Wood 2000a), et au niveau du peroxyosome chez le pois (McLaren *et al.* 1985). L'oxydation de la palmitoylcarnitine dans les mitochondries de mésocarpe d'avocat a été montrée (Panter and Mudd 1973). Ces données suggèrent l'existence d'un système de transport de type navette carnitine au niveau des mitochondries chez les plantes. Dans des extraits de mitochondries de cotylédons de pois, des activités CAT, COT et CPT ont été mesurées. De plus, des activités CPT ont été mises en évidence sur la membrane interne et sur la membrane externe des mitochondries, à l'instar de ce qui est connu chez les animaux (Burgess and Thomas 1986; Thomas and Wood 1986). Cela suggère la présence chez les plantes d'un système de transport similaire à celui des animaux pour l'importation des acides gras dans la matrice mitochondriale. Une carnitine acyltransférase a été purifiée à partir des mitochondries du haricot mungo (*Vigna radiata*) et étudiée. Cette enzyme est caractérisée par une spécificité de substrat très large, étant capable de prendre en charge l'acétate, les acides gras moyenne chaîne et les acides gras longue chaîne (Schwabedissen-Gerbling and Gerhardt 1995). Sa taille, 35 kDa, est inférieure à celle des carnitine acyl(acétyl)transférases animales, entre 70 et 80 kDa. Bien que des activités carnitine acyl(acétyl)transférases ont été détectées, et qu'une enzyme a été purifiée, à ce jour aucune carnitine acyl(acétyl)transférase n'a pu être identifiée chez les végétaux.

Tableau 4 : Localisations subcellulaires des activités carnitine acyl(acétyl)transférases chez les plantes. CAT : carnitine acétyltransférase. COT : carnitine octanoyltransférase. CPT1 : carnitine palmitoyltransférase.

Organite cellulaire	Activités carnitine acyl(acétyl)transférases	Références
Peroxyosome	CAT ; CPT	McLaren <i>et al.</i> 1985
Mitochondrie	CAT ; COT ; CPT1 ; CPT2	Panter & Mudd 1973 Burgess & Thomas 1986 Thomas & Wood 1986
Chloroplaste	CAT ; CPT	McLaren <i>et al.</i> 1985 Masterson & Wood 2000

c. Rôles possibles de la carnitine dans le métabolisme lipidique chez les plantes

i. Trafic intracellulaire des acides gras

La détection par notre équipe d'acylcarnitines dans les plantules d'Arabidopsis, de colza, de lin et de tabac (Bourdin *et al.* 2007; Nguyen *et al.* 2016) a montré que la carnitine intervient dans le métabolisme lipidique chez les plantes. Ceci, avec les mesures d'activité CPT dans les peroxysomes (McLaren *et al.* 1985) et les mitochondries (McLaren *et al.* 1985; Burgess and Thomas 1986; Thomas and Wood 1986; Schwabedissen-Gerbling and Gerhardt 1995), suggère qu'un système de transport des acides gras tel que la navette carnitine puisse exister chez les plantes au niveau du peroxysome ou de la mitochondrie (Figure 3).

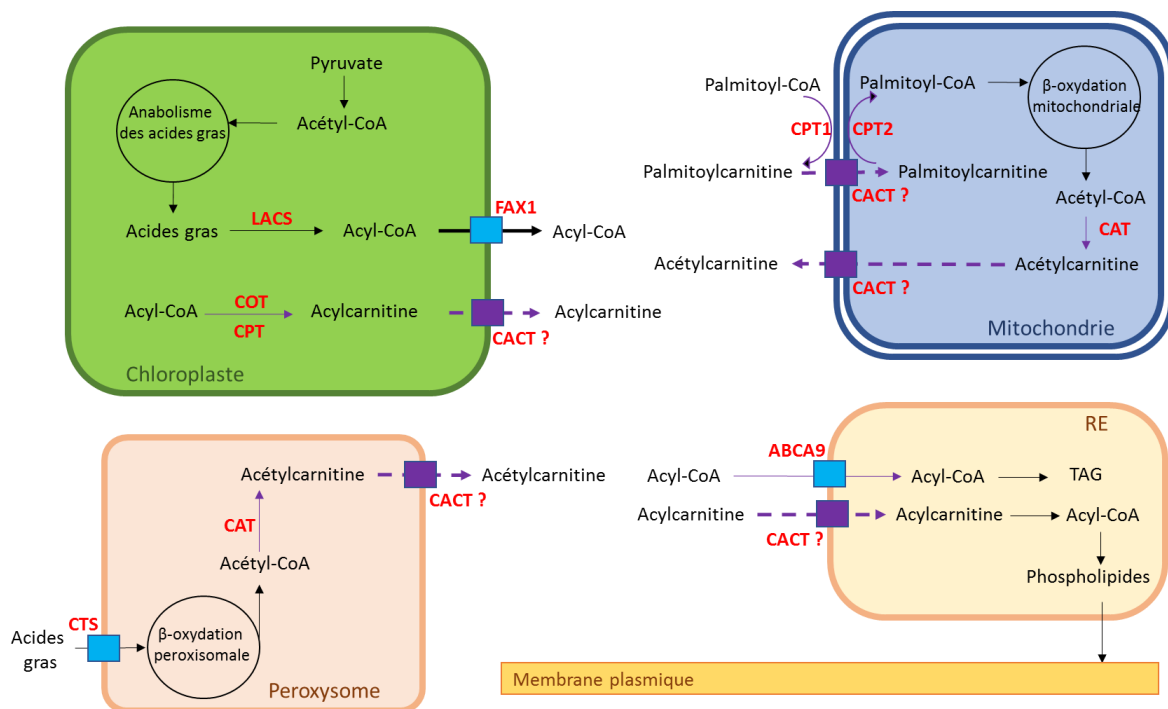


Figure 3 : Principaux rôles biologiques connus ou supposés de la carnitine chez les plantes. Les noms des enzymes sont indiqués en rouge. Les activités liées à la carnitine sont représentées par des flèches violettes, les autres par des flèches noires. Les transporteurs impliquant la carnitine sont représentés en violet, les autres en bleu. Abréviations : ? : activité enzymatique supposée. LACS : long-chain acyl-CoA synthetase. CAT : carnitine acétyltransférase. COT : carnitine octanoyltransférase. CPT : carnitine palmitoyltransférase. FAX : fatty acid export. CACT : carnitine acylcarnitine translocase. CTS : COMATOSE. ABC : ATP binding cassette. TAG : triacylglycérol. CoA : coenzyme A. RE : réticulum endoplasmique.

ii. Trafic peroxysomal (catabolisme)

Chez les plantes oléagineuses, comme *Arabidopsis*, le développement précoce repose sur la β -oxydation des acides gras issus du stock de triacylglycérols (TAG) présent dans les cotylédons ou l'endosperme, au niveau des corps lipidiques (Graham 2008). La β -oxydation génère de l'acétyl-CoA qui permet, *via* le cycle du glyoxylate et la néoglucogénèse, de produire du glucose. Ce glucose fournit l'énergie nécessaire au développement précoce de la plante avant l'établissement de la photoautotrophie (Eastmond and Graham 2001). Chez les plantes, la β -oxydation a lieu dans des peroxysomes spécialisés, les glyoxysomes (Poirier *et al.* 2006), à l'instar des levures. Les animaux aussi recourent à une β -oxydation peroxysomale afin de convertir les acides gras à très longue chaîne en acides gras à chaîne moyenne. Toutefois, l'importation des acides gras dans le peroxysome n'implique pas la carnitine. Ils sont transportés *via* des transporteurs de type ATP binding cassette (ABC) chez les levures (Hettema *et al.* 1996) comme chez les animaux (van Roermund *et al.* 2008). Chez les plantes également, le transporteur COMATOSE (CTS), de type transporteur ABC, est en charge de l'importation des acides gras dans les peroxysomes (Footitt *et al.* 2007). Cependant, chez *S. cerevisiae*, l'acétate produit par la β -oxydation peroxysomale est converti en acétylcarnitine par une CAT. Cette acétylcarnitine est ensuite exportée du peroxysome *via* une CACT, et peut ensuite être importée dans la mitochondrie (Van Roermund *et al.* 1999). Il est donc possible que, chez les plantes également, l'exportation de l'acétate par le peroxysome utilise la carnitine (Figure 3).

iii. Trafic mitochondrial

Plusieurs expériences suggèrent l'existence chez les plantes d'une β -oxydation mitochondriale. Ainsi, le palmitate est oxydé par les extraits de mitochondries des cotylédons du pois (*Pisum sativum*). Cette oxydation requiert du CoASH, des ions Mg^{2+} , de l'ATP, du malate et de la carnitine (Wood *et al.* 1984). De plus, chez le pois, l'étocoxiryl-CoA, un inhibiteur de la CPT1 animale, inhibe la β -oxydation mitochondriale, mais pas la β -oxydation peroxysomale (Masterson and Wood 2009). Ces résultats suggèrent une implication de la carnitine dans le transport d'acides gras dans la mitochondrie en vue de la β -oxydation, et dans l'exportation des acétyl-CoA générés par la β -oxydation mitochondriale (Masterson and Wood 2000b, 2009).

iv. Trafic plastidial

Contrairement aux animaux et aux levures où les acides gras sont synthétisés dans le cytosol, la synthèse des acides gras chez les plantes est réalisée dans le stroma des plastes (Ohlrogge and Browse 1995). Une fois synthétisés, les acides gras doivent être exportés depuis les plastes

vers le réticulum endoplasmique, où ils peuvent être utilisés pour synthétiser des TAG ou des phospholipides. Il a été montré que l'apport de carnitine exogène stimule le verdissement des feuilles chez l'orge (Thomas *et al.* 1981). De plus, des activités CAT ont été détectées dans les chloroplastes de pois (Masterson and Wood 2000a) et l'acétylcarnitine a été identifiée dans les tissus d'*Arabidopsis* (Bourdin *et al.* 2007; Nguyen *et al.* 2016). Ces données suggèrent que l'acétate pourrait être exporté du chloroplaste sous forme d'acétylcarnitine. En soutien à cette hypothèse, la synthèse d'acides gras à partir de l'acétylcarnitine dans les chloroplastes de feuille de pois serait plus importante qu'à partir de l'acétate, du pyruvate et du citrate (Masterson *et al.* 1990). Mais d'autres études ont suggéré au contraire que l'incorporation de l'acétate dans les acides gras est plus élevée qu'à partir de l'acétylcarnitine (Roughan *et al.* 1993). De plus, l'existence d'un complexe pyruvate déshydrogénase chez les plantes montre que l'acétate plastidial provient du pyruvate (Johnston *et al.* 1997). Il est donc peu probable que l'acétylcarnitine détectée chez les plantes (Nguyen *et al.* 2016) soit liée à la synthèse des acides gras.

Une fois synthétisés, la plupart des acides gras sont exportés du chloroplaste vers le cytosol, à l'exception du palmitoléate, qui est plastidial (Li-Beisson *et al.* 2013). La manière dont les acides gras sont exportés n'est pas connue avec précision (Benning 2009; Wang and Benning 2012; Bates *et al.* 2013). La présence d'activités CPT au niveau des chloroplastes de pois (McLaren *et al.* 1985) suggère que la carnitine pourrait être impliquée dans le trafic intracellulaire des acides gras entre le plaste et le réticulum endoplasmique, *via* un système de type navette carnitine, bien que celui-ci n'a pas été identifié (Figure 3).

Cependant, les acides gras néosynthétisés sont activés en acyl-CoA grâce à l'intervention d'une enzyme long-chain acyl-CoA synthetase (LACS). Le transporteur fatty acid export 1 (FAX1), présent sur la membrane interne du chloroplaste, est responsable de l'exportation des acides gras activés, sans utiliser la carnitine (Li *et al.* 2015). FAX1 transporte préférentiellement le palmitate par rapport à l'oléate, alors que ce dernier est l'acide gras majoritairement exporté depuis le chloroplaste (Salas and Ohlrogge 2002). L'intervention d'autres transporteurs de la famille FAX n'est pas exclue. Cependant, le fait que l'oléoylcarnitine est présente en quantité supérieure aux autres acylcarnitines (Nguyen *et al.* 2016) suggère que les acylcarnitines puissent être l'une des formes d'exportation des acides gras du chloroplaste. Notre laboratoire a détecté dans les plantules d'*Arabidopsis* une acylcarnitine qui correspond probablement à la palmitoléylcarnitine (Nguyen *et al.* 2016). Le palmitoléate étant uniquement plastidial, cela suggère une implication de la carnitine dans le métabolisme des acides gras liés à la biogenèse

du plaste. Ce résultat est en accord avec l'enrichissement en acylcarnitines mesuré dans les plantules âgées de 2 jours, au moment où la photoautotrophie se met en place (Nguyen *et al.* 2016).

v. Trafic microsomal

Chez les plantes, comme chez les animaux, les acides gras sont importés depuis le cytosol vers le réticulum endoplasmique, où ils sont notamment utilisés pour la synthèse des glycérolipides (Benning 2009). Chez les animaux, les acides gras peuvent être importés sous forme d'acylcarnitine. Ainsi, dans les réticulocytes, le processus de déacylation/réacylation des phospholipides requiert une activité CPT (Arduini *et al.* 1992). Chez Arabidopsis, une augmentation du contenu en acylcarnitine durant l'organogenèse a été mesurée (Nguyen *et al.* 2016). Elle est concomitante de l'émergence des cotylédons et de la formation des racines à partir des cals. Cette augmentation est accompagnée d'une surexpression des gènes impliqués dans la biosynthèse de glycérolipides. Chez Arabidopsis, le transporteur ABCA9 a été proposé comme étant impliqué dans l'importation des acyl-CoA dans le réticulum endoplasmique, sans intervention de la carnitine (Kim *et al.* 2013). Toutefois, ABCA9 est surtout actif durant le développement de la graine, au moment de l'accumulation des lipides de réserve. Il est donc plus spécifique de la biosynthèse des TAG que de celle des phospholipides. De plus, la biosynthèse des TAG et celle des phospholipides sont localisées à des endroits différents du réticulum endoplasmique (Lacey and Hills 1999). Enfin, chez l'embryon de colza, la quantité d'acylcarnitines durant la phase de biosynthèse membranaire est plus importante que durant la phase d'accumulation des lipides de réserve. Ces données suggèrent que les acylcarnitines seraient impliquées dans la synthèse de lipides membranaires plutôt que dans l'accumulation des TAG (Nguyen *et al.* 2016). Ainsi, l'intervention de la carnitine dans l'importation d'acides gras pour la synthèse microsomale de glycérolipides n'est pas exclue (Figure 3).

d. Transport de la carnitine chez les plantes

Chez Arabidopsis, les transporteurs de la famille organic cation/carnitine transporter (OCT) sont structurellement et biochimiquement proches des transporteurs animaux de carnitine membranaires de la famille OCTN : OCTN1, 2 et 3. La famille OCT compte 7 membres. AtOCT2, 3, 4, 5 et 6 sont localisées sur le tonoplaste (Küfner and Koch 2008) et AtOCT1 est localisé au niveau la membrane plasmique (Lelandais-Brière *et al.* 2007). AtOCT1 est capable de restaurer la capacité de la levure *S. cerevisiae* double mutante $\Delta cit2/\Delta agp2p$, affectée dans

le transporteur de carnitine AGP2, à se développer sur un milieu de culture contenant de l'oléate comme source unique de carbone, en présence de carnitine (Lelandais-Brière *et al.* 2007). Les transcrits de AtOCT1 sont détectés dans tous les organes, et particulièrement dans les organes de reproduction (boutons floraux, fleurs et jeunes siliques), au niveau des tissus vasculaires des parties reproductrices, du collet et des racines (Lelandais-Brière *et al.* 2007). Ils s'accumulent durant la germination, plus particulièrement au moment de l'émergence de la radicule. Une fusion du gène de la β -glucuronidase (GUS) avec le promoteur de AtOCT1 montre une forte expression dans les anthères, les sépales, les pétales et le pédoncule (Lelandais-Brière *et al.* 2007). Dans les plantules, il est exprimé essentiellement dans les tissus vasculaires, surtout au niveau du collet et des racines (Lelandais-Brière *et al.* 2007). Le transport de la carnitine par OCT1 n'a cependant pas été montré.

Le mutant *oct1-1* porte un T-DNA dans le gène *OCT1* (Lelandais-Brière *et al.* 2007). Des expériences par RT-PCR montrent qu'il est incapable d'exprimer ce gène. Le mutant *oct1-1* est caractérisé par un système racinaire plus important que celui du sauvage, avec plus de racines latérales. Les autres transporteurs de la famille OCT sont affectés chez ce mutant, ce qui suggère qu'il existerait une régulation entre les différents AtOCT. Ainsi, la quantité de transcrits de *AtOCT3*, *4* et *6* est significativement supérieure dans les plantules âgées de 7 jours (Lelandais-Brière *et al.* 2007). Le mutant *oct1-1* est, de plus, insensible à la présence de carnitine dans le milieu de culture. En effet, chez la plante sauvage, la carnitine exogène réduit fortement la longueur de la racine principale et augmente la densité de racines secondaires. Ces effets ne sont pas observés chez *oct1-1* (Lelandais-Brière *et al.* 2007).

e. Rôles possibles de la carnitine dans le maintien de la fonction cellulaire

i. Protection contre le stress salin

Les plantes, comme les animaux, utilisent des osmolytes pour se prémunir contre le stress salin (Yancey *et al.* 1982). Plusieurs types de molécules peuvent être utilisés par les plantes, notamment des sucres, des polyols, des acides aminés comme la proline, et des composés à ammonium quaternaire comme la glycine bêtaïne. La carnitine est un composé à ammonium quaternaire, proche de la glycine bêtaïne (Peluso *et al.* 2000). Comme chez les animaux et les bactéries, la carnitine peut intervenir dans la protection contre le stress osmotique. Notre équipe a montré que, tout comme la proline, la carnitine exogène se comporte comme un composé compatible, capable de protéger les plantes contre le stress salin (Charrier *et al.* 2012). En conditions de stress salin, la présence de carnitine dans le milieu de culture augmente le taux

de germination des graines, ainsi que le taux de survie des plantules. Cependant, le stress salin n'entraîne pas une accumulation de carnitine endogène dans les plantules à une concentration suffisante pour un osmolyte (Charrier *et al.* 2012). Mais il faut noter que les quantifications ont été réalisées sur la plante entière. Une accumulation de carnitine dans des organes ou des tissus spécifiques, comme pour la glycine bêtaïne, qui s'accumule essentiellement dans le plaste pour protéger la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (rubisco) et le thylakoïde (Ashraf and Foolad 2007; Chen and Murata 2008), ne peut être exclue.

ii. Protection contre le stress oxydatif

Notre équipe a montré que, chez *Arabidopsis*, la carnitine exogène, comme la proline, a un effet protecteur contre le stress oxydatif (Charrier *et al.* 2012). Elle améliore le taux de survie des plantules en présence de peroxyde d'hydrogène dans le milieu de culture (Charrier *et al.* 2012). Chez l'Homme, la carnitine exogène augmente la production de monoxyde d'azote (NO) et décroît l'activité arginase, ce qui protège les cellules contre le cancer. Or, chez les plantes, le monoxyde d'azote est impliqué dans la signalisation contre le stress abiotique (Neill *et al.* 2008). Cela suggère que la carnitine pourrait intervenir dans la résistance contre le stress oxydatif *via* la signalisation hormonale.

iii. Régulation hormonale

Chez *Arabidopsis*, l'apport de carnitine exogène module l'activité de certains gènes, en particulier des gènes impliqués dans la résistance au stress salin et la voie de signalisation de l'acide abscissique (Charrier *et al.* 2012). De plus, l'effet protecteur de la carnitine est moins important sur le mutant *abi1-1*, affecté dans la biosynthèse de l'acide abscissique et la réponse à l'acide abscissique (Charrier *et al.* 2012). Ces résultats suggèrent que la carnitine, comme la proline, seraient impliquées dans la voie de signalisation de l'acide abscissique.

4. Biosynthèse de la carnitine

a. Biosynthèse de la carnitine chez les animaux et les levures

Chez l'homme, 75 % de la carnitine provient de l'alimentation. Les 25 % restants sont synthétisés par l'organisme, principalement dans les reins, le foie, et, dans une moindre mesure, le cerveau (Vaz and Wanders 2002). La voie de biosynthèse de la carnitine a été élucidée chez les mammifères (Vaz *et al.* 2000) et chez les levures (Strijbis *et al.* 2009). Le premier précurseur

de la carnitine est la 6-*N*-triméthyllysine (TML). Elle peut être issue de la dégradation par le protéasome ou le lysosome de protéines contenant de la lysine triméthylée, telles que la calmoduline, les histones, le cytochrome c ou encore la myosine (Servillo *et al.* 2014). Il est également probable que la TML animale provienne de l'alimentation végétale. En effet, la TML est présente en quantité notable chez les végétaux (Rippa *et al.* 2012). La carnitine issue de dégradation de protéines, plus coûteuse en termes d'énergie, pourrait être restreinte aux périodes de jeûne (Servillo *et al.* 2014). Chez les animaux et les levures, la TML est convertie en carnitine *via* 4 réactions enzymatiques (Figure 4).

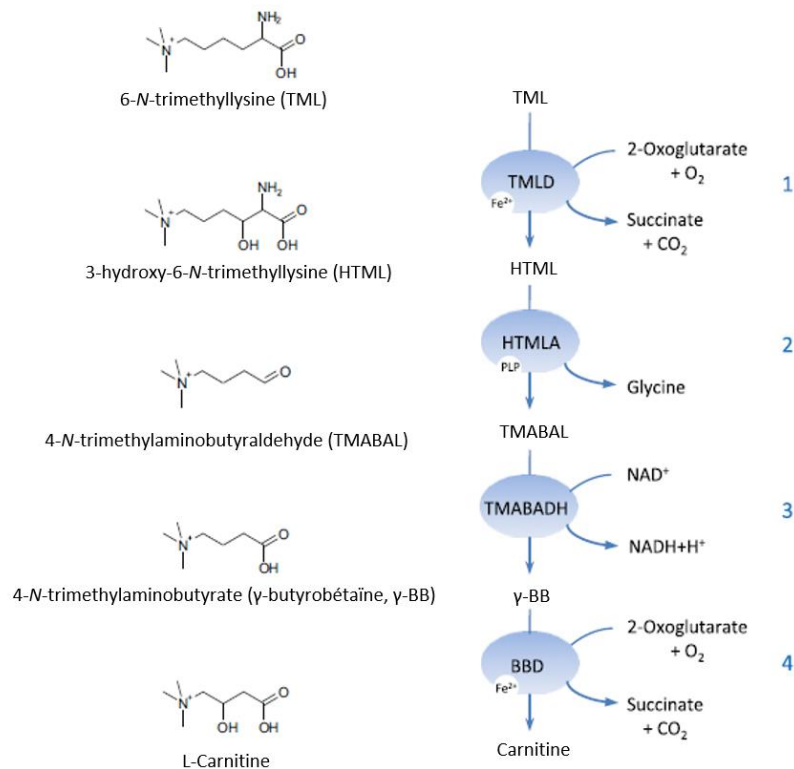


Figure 4 : Voie de biosynthèse de la carnitine chez les animaux et les levures. Abréviations . TMLD : triméthyllysine dioxygénase. HTMLA : HTML aldolase. TMABADH : 4-*N-N-N*-triméthyl-4-aminobutyraldéhyde déshydrogénase. BBD : butyrobétaine dioxygénase. PLP : 5^e phosphate de pyroxidal. Les chiffres à droite indiquent l'ordre des étapes. D'après Vaz et Wanders, 2002.

i. Hydroxylation de la TML

La TML est d'abord hydroxylée en 3-hydroxy-6-*N*-triméthyllysine (HTML) par la TML dioxygénase (TMLD ; EC 1.14.11.8). Cette enzyme utilise le fer comme cofacteur et le 2-oxoglutarate comme cosubstrat (Figure 4). En plus de la carnitine, elle produit du succinate et du CO₂. Chez l'Homme et le rat, elle est identifiée au niveau du rein, du foie, du cerveau et du cœur (Rebouche and Engel 1980). Elle est située sur la membrane externe de la mitochondrie

(Hulse *et al.* 1978; Sachan and Hoppel 1980; Vaz and Wanders 2002). Une TMLD a été identifiée chez le champignon *Candida albicans* par une recherche d'homologie avec la séquence de la TMLD humaine. La protéine orf19.4316 partage 35 % de similarité avec la séquence humaine. Le mutant perte de fonction pour *orf19.4316* est incapable de se développer sur un milieu contenant de l'oléate comme source unique de carbone. La transformation de ce mutant avec le gène codant la TMLD humaine restaure sa capacité à se développer sur ce milieu. Cette expérience a confirmé que la protéine orf19.4316 de *C. albicans* est impliquée dans la voie de biosynthèse de la carnitine (Strijbis *et al.* 2009).

ii. Conversion de la HTML en TMABAL

La HTML est ensuite convertie en *N-N-N*-triméthyl-4-aminobutyraldéhyde (TMABAL) et en glycine par la HTML aldolase (HTMLA ; EC 4.1.2.X). La HTMLA utilise le 5' phosphate de pyroxidal (PLP) comme cofacteur (Figure 4). Cette activité est cytosolique, et est particulièrement élevée dans les cellules du foie (Rebouche and Engel 1980). La HTMLA pourrait être une sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT ; EC 2.1.2.1) (Vaz and Wanders 2002). En effet, il a été montré chez le lapin que la SHMT peut convertir l'HTML en TMABAL (Hulse and Henderson 1980). Chez *C. albicans*, les gènes *GLY1* et *orf19.6305* codent pour des thréonine aldolases. Ces dernières sont considérées comme des homologues de l'HTMLA humaine (Strijbis *et al.* 2009). Cependant, contrairement aux mutants perte de fonction pour les autres enzymes de la voie de biosynthèse de la carnitine, le mutant *htmla/gly1* est capable de se développer sur un milieu contenant de l'oléate comme source unique de carbone. Une troisième enzyme, de la famille SHMT, est proposée comme possiblement impliquée dans cette étape de la voie de biosynthèse de la carnitine (Strijbis *et al.* 2010).

iii. Oxydation du TMABAL

Le TMABAL est ensuite oxydé en γ -butyrobétaine (ou 4-*N*-triméthylaminobutyrate) par la TMABAL déshydrogénase (TMABADH ; EC 1.2.1.47) (Figure 4). Chez les animaux, la TMABADH appartient à la superfamille des aldéhyde déshydrogénases (ALDH ; EC 1.2.1.3) (Abe *et al.* 1990; Kikonyogo and Pietruszko 1996; Vaz *et al.* 2000; Vaz and Wanders 2002) et à la famille ALDH9. Chez l'Homme, la vache et le rat, cette enzyme cytoplasmique est présente dans plusieurs organes, principalement dans le foie et les reins, mais aussi dans le cerveau, le cœur et les muscles (Hulse *et al.* 1978; Hulse and Henderson 1980). Chez *C. albicans*, la TMABADH a été identifiée par homologie de séquence avec l'ALDH9 humaine. Le mutant perte de fonction pour cette protéine est incapable de se développer sur un milieu contenant de

l'oléate comme source unique de carbone. Il peut en revanche se développer sur un milieu contenant de la γ -butyrobétaïne, ce qui confirme son implication dans la synthèse de ce composé (Strijbis *et al.* 2009).

iv. Oxydation de la γ -butyrobétaïne en carnitine

Enfin, la γ -butyrobétaïne est convertie en carnitine par la γ -butyrobétaïne dioxygénase (BBD ; EC 1.14.11.1). La BBD humaine est une protéine cytosolique de 44,7 kDa, encodée par un gène de 1161 paires de bases (Vaz *et al.* 1998). Cette enzyme est exprimée essentiellement dans le rein, le foie et, faiblement, dans le cerveau (Vaz *et al.* 1998). La BBD a une séquence proche de celle de la TMLD, et catalyse une réaction similaire. Elle utilise aussi le fer comme cofacteur et le 2-oxoglutarate comme cosubstrat (Lindstedt and Lindstedt 1970). Elle produit du succinate et du CO₂ en plus de la carnitine. Cette enzyme peut être inhibée par le 3-(2,2,2-triméthylhydrazine) propionate (THP). La caractérisation biochimique de la BBD animale a été réalisée en utilisant de la γ -butyrobétaïne radiomarquée (Lindstedt and Lindstedt 1970), ou bien par la quantification de la carnitine par spectrométrie de masse (Leung *et al.* 2010; Tars *et al.* 2010).

b. Biosynthèse de la carnitine chez les plantes

Il est possible que les plantes puissent importer la carnitine du sol *via* l'absorption racinaire, comme d'autres composés à ammonium quaternaire (Warren 2013). Cependant, la détection de carnitine chez des plantes cultivées en conditions axéniques indique qu'une part de la carnitine est synthétisée *de novo* par la plante. Ainsi, la triméthyllysine et la γ -butyrobétaïne, deux précurseurs de la carnitine connus chez les animaux et les levures, ont été détectées et quantifiées chez *Arabidopsis* par notre équipe (Rippa *et al.* 2012). D'autre part, l'ajout de TML deutérée dans le milieu de culture permet la synthèse endogène de γ -butyrobétaïne et de carnitine deutérées. Ainsi, la voie de biosynthèse de la carnitine pourrait suivre les mêmes étapes que chez les animaux et les levures, impliquant les mêmes activités enzymatiques (Rippa *et al.* 2012; Zhao 2014).

i. Recherche d'enzymes par analyses bioinformatiques

Une recherche d'homologie utilisant l'outil basic local alignment search tool (BLASTP) a permis d'identifier chez *Arabidopsis* des candidats pour la deuxième et la troisième étapes de la voie de biosynthèse de la carnitine (Rippa *et al.* 2012). Les 7 sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT ; EC 2.1.2.1) d'*Arabidopsis*, localisées dans le cytosol, partagent une importante

homologie avec la HTMLA de l'Homme. L'une de ces isoformes, SHMT1, partage 58 % d'identité et 74 % de similarité de séquence avec celle de l'Homme. Bien qu'elle soit impliquée dans la photorespiration (Voll *et al.* 2006), il reste possible qu'elle puisse aussi intervenir dans la voie de biosynthèse de la carnitine. En outre, chez Arabidopsis, les thréonines aldolases THA1 et THA2 partagent respectivement 36 % et 37 % d'identité de séquence avec la HTMLA de *C. albicans*. Il est donc également possible que ces enzymes soient impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine. Chez Arabidopsis, les enzymes ALDH2 et ALDH10 partagent respectivement 37 % et 38 % d'identité de séquence avec l'ALDH9 humaine et la TMABADH de *C. albicans*. Les ALDH10 du pois sont capables de convertir le TMABAL en γ -butyrobétaïne *in vitro* (Tylichová *et al.* 2010). Ce sont donc de bons candidats pour être impliqués dans la voie de biosynthèse de la carnitine.

En revanche, jusqu'à présent, aucun candidat n'a pu être identifié chez les plantes pour la première et la dernière étape de la voie de biosynthèse de la carnitine. Néanmoins, des orthologues de la BBD et de la TMLD humaines ont été identifiées dans les génomes de *Drosophila melanogaster* et de *Caenorhabditis elegans* (Vaz and Wanders 2002). Cela suggère une forte conservation de ces enzymes chez les animaux, et, par extension, peut-être chez les plantes aussi. De plus, chez les plantes, la teneur en carnitine est réduite de 50 % en présence de THP dans le milieu de culture (Rippa *et al.* 2012). Ce dernier étant un inhibiteur de la BBD animale, l'enzyme en charge de l'oxydation de la γ -butyrobétaïne en carnitine chez les plantes pourrait donc avoir des propriétés similaires à celle des animaux.

B. Les enzymes ALDH10 chez les plantes

Une étude bioinformatique a donc montré que les enzymes ALDH10 d'*Arabidopsis* sont fortement homologues aux TMABADH animales et fongiques, responsables de la conversion du TMABAL en γ -butyrobétaïne, le précurseur direct de la carnitine (Rippa *et al.* 2012; Zhao 2014). Les ALDH10 pourraient donc intervenir dans la voie de biosynthèse de la carnitine chez les plantes. Elles appartiennent à la même superfamille que les TMABADH humaine et fongiques : les aldéhyde déshydrogénases (ALDH ; EC 1.2.1.3), spécialisées dans la conversion des aldéhydes en acides aminés. Les ALDH peuvent oxyder de nombreux composés, et ainsi intervenir dans des processus physiologiques variés.

1. La superfamille ALDH

Les ALDH, aussi dénommées aldéhyde/NAD(P)⁺ oxydoréductases, forment une superfamille d'enzymes, identifiée chez l'ensemble du vivant, capable d'oxyder une grande variété d'aldéhydes en acides carboxyliques. Elles utilisent comme cofacteur le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) ou le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP⁺) (généralement l'un ou l'autre, parfois les deux) (Marchitti *et al.* 2008). En oxydant les aldéhydes, qui peuvent être délétères pour les fonctions biologiques, les ALDH jouent un rôle dans la protection cellulaire. Elles peuvent aussi intervenir dans la fixation de composés chimiques toxiques (Reeve and Miller 2002).

a. Familles d'ALDH à l'échelle du vivant

Les ALDH sont identifiées chez les bactéries, les archées et les eucaryotes, ce qui suggère une apparition ancienne (Sophos and Vasiliou 2003). La plupart des organismes possèdent plusieurs ALDH : de 1 à 5 chez les archées, de 1 à 26 chez les eubactéries, et de 8 à 17 chez les eucaryotes (Sophos and Vasiliou 2003). Des ALDH sont classées dans la même famille lorsqu'elles partagent au moins 40% d'identité (Vasiliou *et al.* 1999). Selon ce critère, 24 familles ALDH sont décrites chez les eucaryotes, dont 15 sont présentes chez les plantes (Tableau 5) (Sophos and Vasiliou 2003; Brocker *et al.* 2013). Trois d'entre elles : ALDH4, ALDH5 et ALDH18, sont communes aux champignons, aux plantes et aux animaux. Quatre familles : ALDH2, ALDH3, ALDH6 et ALDH7 sont communes aux animaux et aux plantes. La famille ALDH1 est présente chez les animaux et les champignons. La famille ALDH10 est commune aux plantes et aux champignons. ALDH13 et ALDH20 sont spécifiques des protozoaires. ALDH14,

ALDH15 et ALDH16 n'existent que chez les champignons. Trois familles : ALDH8, ALDH9 et ALDH17, sont représentées uniquement chez les animaux. Enfin, 7 familles sont connues seulement chez les plantes : ALDH11, ALDH12, ALDH19, ALDH21, ALDH22, ALDH23 et ALDH24. ALDH21 n'est par ailleurs documentée que chez les bryophytes (Chen *et al.* 2008).

Tableau 5 : Répartition chez les eucaryotes des 24 familles d'aldéhyde déshydrogénases (ALDH) identifiées, selon Sophos & Vasiliou, 2003 et Brocker et al. 2013.

Règne	Familles présentes
Animaux	ALDH1 ; ALDH2 ; ALDH3 ; ALDH4 ; ALDH5 ; ALDH6 ; ALDH7 ; ALDH8 ; ALDH9 ; ALDH17 ; ALDH18
Champignons	ALDH1 ; ALDH4 ; ALDH5 ; ALDH10 ; ALDH14 ; ALDH15 ; ALDH16 ; ALDH18
Plantes	ALDH2 ; ALDH3 ; ALDH4 ; ALDH5 ; ALDH6 ; ALDH7 ; ALDH10 ; ALDH11 ; ALDH12 ; ALDH18 ; ALDH19 ; ALDH21 ; ALDH22 ; ALDH23 ; ALDH24
Protozoaires	ALDH13 ; ALDH20

b. Les ALDH chez les plantes

Chez *Arabidopsis*, 14 ALDH sont identifiées, réparties dans 9 familles différentes. Le génome d'*Arabidopsis* code pour deux isoenzymes ALDH2, trois ALDH3, deux ALDH5, une ALDH6, une ALDH7, deux ALDH10, une ALDH11, une ALDH12 et une ALDH22 (Kirch *et al.* 2004; Brocker *et al.* 2013). Ces enzymes ont des localisations subcellulaires différentes (Tableau 6), et interviennent dans plusieurs fonctions biologiques.

Tableau 6 : Localisation subcellulaire des enzymes de la superfamille ALDH chez *Arabidopsis*, lorsqu'elle est connue.

Organite	ALDH présentes
Mitochondrie	ALDH2B4 ; ALDH2B7 ; ALDH5 ; ALDH6 ; ALDH12
Peroxisome	ALDH10A9
Plaste	ALDH3I1 ; ALDH10A8
Cytosol	ALDH2C4 ; ALDH7 ; ALDH11
Réticulum endoplasmique	ALDH3F1 ; ALDH22
Appareil de Golgi	ALDH3H1

Les ALDH2 sont des enzymes mitochondriales ou cytosoliques, impliquées dans l'oxydation de l'acétaldéhyde produit par la fermentation éthanolique (Wei *et al.* 2009). Chez le maïs, une

ALDH2 est responsable de la restauration de la stérilité mâle cytoplasmique (Niu *et al.* 2007). Chez *Arabidopsis*, trois ALDH2 sont identifiées : ALDH2B7 et ALDH2B4, toutes deux mitochondriales, et ALDH2C4 qui est cytosolique (Kirch *et al.* 2004).

Les ALDH3 interviennent essentiellement dans la détoxification d'aldéhydes et dans la réponse au stress abiotique (Brocker *et al.* 2013). Elles sont régulées par l'acide abscissique, le stress osmotique et oxydatif, les métaux lourds ou encore les pesticides. *Arabidopsis* possède trois ALDH3 : ALDH3F1, localisée dans le réticulum endoplasmique (Dunkley *et al.* 2006), ALDH3I1, localisée dans les plastes des feuilles (Kleffmann *et al.* 2004), et ALDH3H1, localisée dans l'appareil de Golgi, la vacuole, et le réticulum endoplasmique (Dunkley *et al.* 2006).

Les ALDH5 catalysent l'oxydation de l'acide succinique, résultant du catabolisme du GABA. Une ALDH5 mitochondriale est identifiée chez *Arabidopsis* (Kirch *et al.* 2004; Brocker *et al.* 2013). Les ALDH6 sont des méthylmalonyl semialdéhyde déshydrogénases. Elles sont associées au catabolisme de la valine et des pyrimidines, et utilisent le coenzyme A comme cofacteur. Leurs fonctions exactes ne sont pas élucidées (Kirch *et al.* 2004; Brocker *et al.* 2013). Les ALDH7, ou antiquitines, sont également régulées par le stress (rayons UV, salinité, manque d'eau et choc thermique, notamment) et sont induites par l'acide abscissique. ALDH7 a été localisée dans le protéome du cytosol (Ito *et al.* 2016). Elles sont impliquées dans la régulation de la pression de turgescence chez le pois (Guerrero *et al.* 1990) et chez le colza (Strocher *et al.* 1995).

Les ALDH10 sont principalement actives sur les aminoaldéhydes. Elles sont essentiellement étudiées pour leur rôle dans la synthèse de glycine bêtaïne, un osmoprotectant très efficace, chez certaines espèces (Fitzgerald *et al.* 2009). Elles sont également impliquées dans le catabolisme des polyamines (Sebela *et al.* 2000). Chez *Arabidopsis*, deux ALDH10 sont décrites : ALDH10A8, localisée dans les leucoplastes ou les plastes, et ALDH10A9, localisée dans le peroxyosome (Missihoun *et al.* 2011; Zarei *et al.* 2016).

Les ALDH11 sont des enzymes cytosoliques. Elles catalysent l'oxydation du glycéraldéhyde 3-Phosphate en 3-phosphoglycérate (Kirch *et al.* 2004; Brocker *et al.* 2013). Les ALDH12 sont impliquées dans la dégradation de la proline en glutamate. Ces enzymes sont présentes dans la matrice mitochondriale chez *Arabidopsis* (Kirch *et al.* 2004; Brocker *et al.* 2013). ALDH12A1 est impliquée dans la dégradation de la proline en glutamate (Deuschle *et al.* 2001, 2004). Les

ALDH18 catalysent la conversion du glutamate en pyrroline-5-carboxylate, un précurseur de l'ornithine ; qui permet la synthèse de proline (Kirch *et al.* 2004; Brocker *et al.* 2013).

Les ALDH21, 22, 23 et 24 ont été identifiées récemment et peu de données sont actuellement disponibles les concernant (Kirch *et al.* 2004; Brocker *et al.* 2013). ALDH22 a été identifiée dans le réticulum endoplasmique (Dunkley *et al.* 2006), et il semble que cette protéine puisse être sécrétée dans l'espace extracellulaire.

2. Les ALDH10 végétales

Certaines ALDH sont principalement actives sur les aldéhydes portant une fonction amine ou triméthylammonium : les aminoaldéhydes. Elles sont appelées aminoaldéhyde déshydrogénases (AMADH) ou bétaine aldéhyde déshydrogénase (BADH). Cette catégorie d'ALDH a d'abord été décrite sur le modèle animal, comme étant des enzymes capables d'oxyder la bétaine aldéhyde (BAL) (Rothschild and Guzman 1954). Chez les animaux, l'enzyme ALDH9 appartient à la catégorie fonctionnelle des AMADH. Elle est impliquée dans la voie de biosynthèse de la carnitine, en convertissant le TMABAL en γ -butyrobétaine (Vaz *et al.* 2000). Chez les plantes, les enzymes de la famille ALDH10 partagent entre 35 % et 39 % d'identité avec l'ALDH9 humaine (Kirch *et al.* 2004). Elles sont également classées dans la catégorie fonctionnelle des AMADH, étant capables de convertir efficacement des aminoaldéhydes en acides aminés (Sophos and Vasiliou 2003).

a. La diversité des ALDH10

Les ALDH10 ont été identifiées chez tous les principaux groupes de plantes. Le nombre d'isoenzymes varie selon l'espèce. Les algues et les mousses ne possèdent qu'une ALDH10 (Muñoz-Clares *et al.* 2014). La plupart des angiospermes, dont le pois, la tomate (*Solanum lycopersicum*), l'épinard et Arabidopsis comportent deux isoenzymes (Tylichová *et al.* 2010; Missihoun *et al.* 2011; Kopečný *et al.* 2013). Chez Arabidopsis, elles sont appelées ALDH10A8 et ALDH10A9 (Kirch *et al.* 2004; Missihoun *et al.* 2011). Le ricin n'en possède qu'une. Le maïs et la vigne (*Vitis vinifera*) en possèdent trois (Brocker *et al.* 2013; Muñoz-Clares *et al.* 2014). Les séquences des ALDH10 sont très conservées à l'échelle des angiospermes, partageant 70 % à 85 % d'identité entre elles, pour seulement 20% d'identité avec les AMADH animales (Sebela *et al.* 2000).

Les ALDH10 sont capables d'oxyder une importante diversité d'α-aminoaldéhydes en leurs acides aminés correspondants (Figure 5). Dans une moindre mesure, des aldéhydes aliphatiques (Tylichová *et al.* 2010) ou aromatiques (Frömmel *et al.* 2012), ou encore des dérivés N-acyl des α-aminoaldéhydes (Frömmel *et al.* 2014), peuvent parfois être pris en charge. Elles peuvent utiliser le NAD⁺ et le NADP⁺ comme cofacteur (Weigel *et al.* 1986), mais toutes les ALDH10 caractérisées utilisent le NAD⁺ comme cofacteur préférentiel (Weigel *et al.* 1986; Arakawa *et al.* 1990; Oguri *et al.* 2003; Tylichová *et al.* 2010).

Ainsi, les ALDH10 peuvent convertir la β-aldéhyde (BAL) en glycine β-alaïne, le 4-aminobutyraldéhyde (ABAL) en γ-aminobutyrate (GABA), le 3-aminopropionaldéhyde (APAL) en β-alanine, ou encore le TMABAL en γ-butyrobétaïne (Figure 5). Cependant, la spécificité de substrat varie selon l'espèce végétale et l'isoenzyme. Certaines, parfois appelées « BADH vraies » (Fitzgerald *et al.* 2009) sont particulièrement actives sur la BAL. C'est le cas de l'ALDH10 du plaste de l'épinard (dénommée SoBADH dans la littérature¹). D'autres, comme les ALDH10 du pois (PsAMADH1 et PsAMADH2) (Tylichová *et al.* 2010), du maïs (ZmAMADH1a, ZmAMADH1b et ZmAMADH2) et de la tomate (SlAMADH1 et SlAMADH2) (Kopečný *et al.* 2013) sont peu actives sur la BAL, mais oxydent efficacement les α-aminoaldéhydes linéaires, comme l'APAL et/ou l'ABAL.

Certaines ALDH10 sont plus généralistes, et peuvent en charge efficacement une plus grande diversité de substrats, incluant d'autres aldéhydes, dépourvus de fonction amine et de groupement triméthylammonium (Kopečný *et al.* 2013). Ainsi, SlAMADH1 peut oxyder efficacement l'ABAL, la BAL, le 4-guanidinobutyraldéhyde (GBAL), et d'autres aldéhydes et des dérivés méthyle ou guanidine de l'APAL et l'ABAL (Kopečný *et al.* 2013). De même, une ALDH10 de la betterave (*Beta vulgaris*) peut oxyder efficacement la BAL, l'APAL, l'ABAL et le 3-diméthylsulfuropropionaldéhyde (DMSPAL) (Trossat *et al.* 2016).

¹ L'épinard possédant une deuxième isoenzyme, pour éviter toute confusion, SoBADH a été dénommée SoBADH1 dans ce mémoire. La deuxième isoforme a été dénommée SoBADH2.

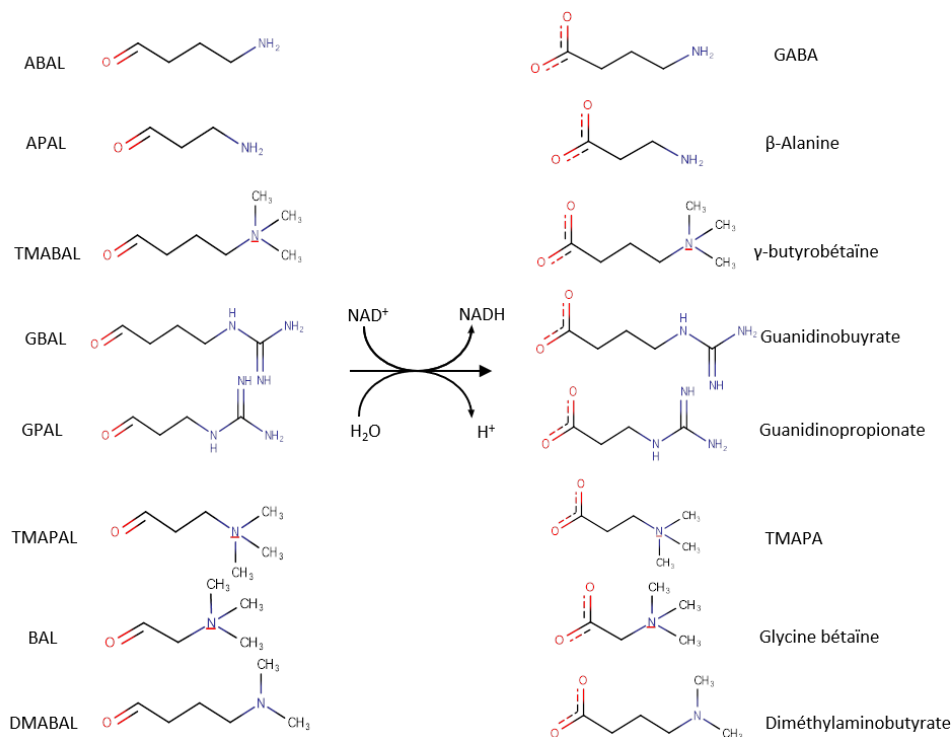


Figure 5 : Diversité des principaux substrats pouvant être pris en charge par les ALDH10, et produits correspondants. Abréviations : APAL : 3-aminopropionaldéhyde. BAL : bétaine aldéhyde. TMABAL : *N-N-N*-triméthyl-4-aminobutyraldéhyde. ABAL : 4-aminobutyraldéhyde. GPAL : 3-guanidinopropionaldéhyde. GBAL : 4-guanidinobutyraldéhyde. TMAPAL : *N-N-N*-triméthyl-3-aminopropionaldéhyde. DMABAL : diméthyl-4-aminobutyraldéhyde. GABA : acide γ -aminobutyrique. TMAPA : *N-N-N*-triméthyl-3-aminopropionate.

b. Histoire évolutive des ALDH10

Les ALDH10 des plantes terrestres forment un groupe monophylétique (Figure 6A), tout comme celles des spermatophytes et celles des angiospermes. Les ALDH10 des monocotylédones et celles des eudicotylédones forment deux groupes distincts, ce qui suggère une duplication antérieure à leur séparation (Fitzgerald *et al.* 2009; Muñoz-Clares *et al.* 2014) (Figure 6B). Les ALDH10 ne se regroupent pas en fonction de leur spécificité de substrat. Chez les monocotylédones, un événement de duplication a eu lieu chez les poacées. Il est à l'origine de la présence de deux isoenzymes chez le riz (*Oryza sativa*) (OsAMADH1 et OsAMADH2) et l'orge (*Hordeum vulgare*) (HvAMADH1 et HvAMADH2), et de trois chez le maïs (ZmAMADH1a, ZmAMADH1b et ZmAMADH2), qui a connu une duplication supplémentaire (Figure 6B) (Muñoz-Clares *et al.* 2014). Chez les eudicotylédones, au moins quatre événements indépendants de duplication ont eu lieu (Figure 7). Les fabacées, les salicacées, les solanacées et les amarantacées, ont subi une duplication indépendante (Muñoz-Clares *et al.* 2014). La duplication ayant eu lieu chez les fabacées est à l'origine des deux

isoenzymes PsAMADH1 et PsAMADH2. D'après cette analyse phylogénétique, ALDH10A9 d'Arabidopsis est la première à avoir divergé. Les ALDH10 de l'ensemble des eudicotylédones sont des orthologues de ALDH10A8 d'Arabidopsis.

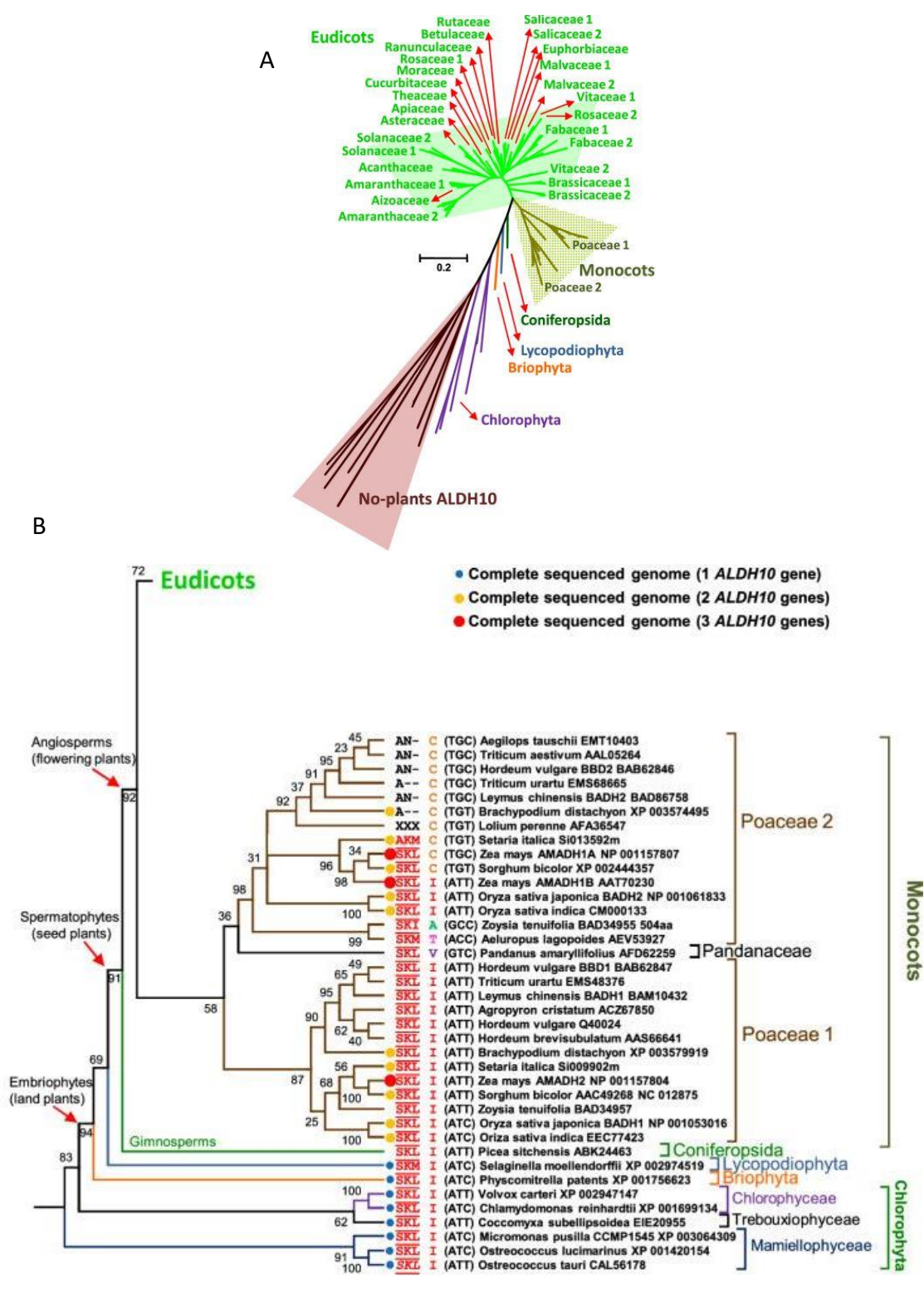


Figure 6 : Phylogénie des ALDH10. (A) Arbre phylogénétique non enraciné des ALDH10 de l'ensemble des plantes. (B) Arbre phylogénétique des ALDH10 des plantes. La présence d'un tripeptide SKL en position C-terminale est indiquée. Selon Muñoz-Clares et al. 2014.

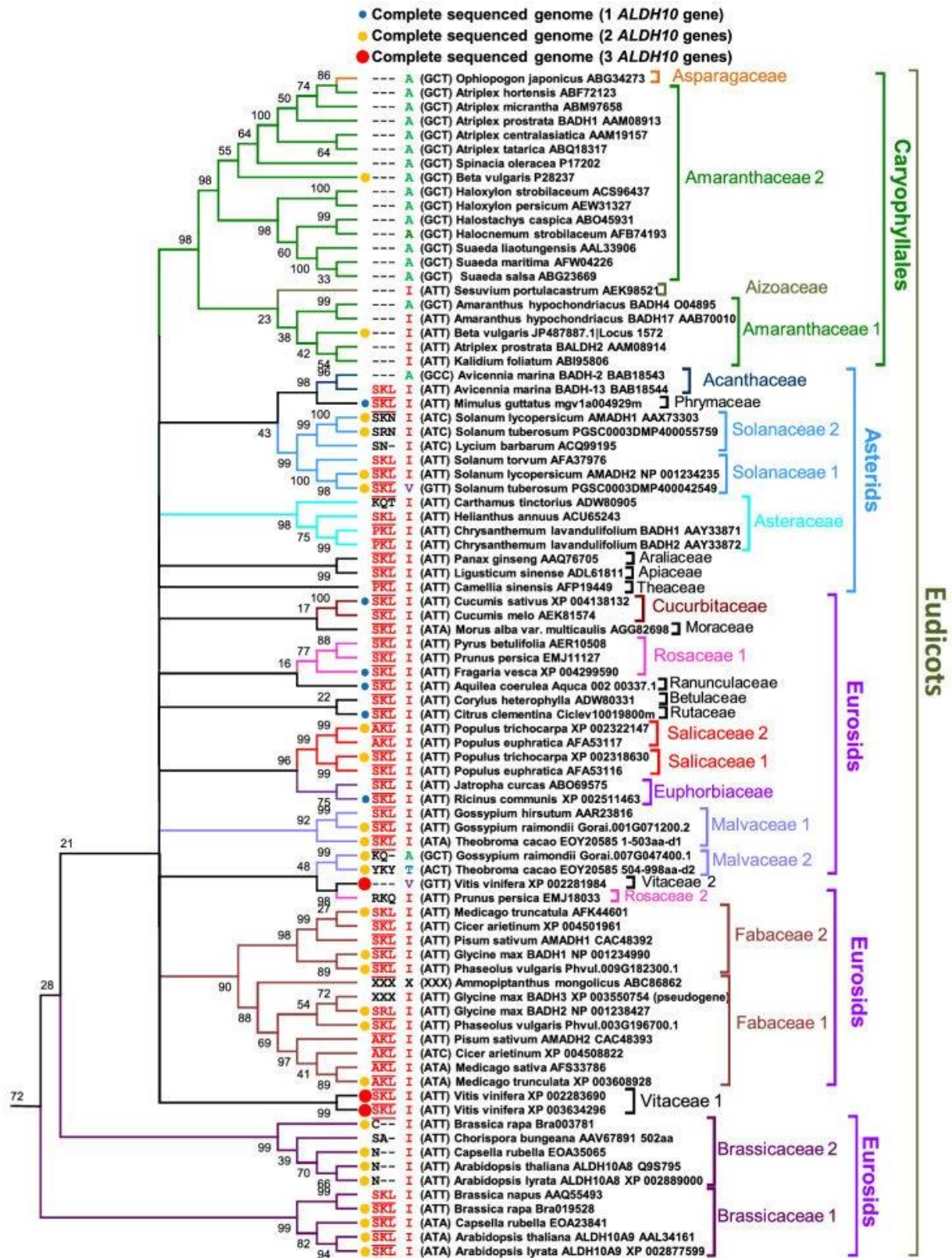


Figure 7 : Arbre phylogénétique des ALDH10 des eudicotylédones. La présence d'un tripeptide SKL en position C-terminale est indiquée. Selon Muñoz-Clares et al. 2014.

c. Localisation cellulaire des ALDH10

La localisation subcellulaire des ALDH10 diffère selon l'espèce et l'isoenzyme. Elles peuvent être localisées dans le cytosol, le peroxyosome, ou le plaste. Environ la moitié des ALDH10 qui ont été étudiées comportent un tripeptide SKL en position C-terminale (Tableau 7) (Fitzgerald *et al.* 2009), qui est une séquence d'adressage au peroxyosome (Gould *et al.* 1988; Reumann *et al.* 2009). C'est notamment le cas de PsAMADH1, de SIAMADH1, des trois isoenzymes du maïs, de HvBADH1 et de AtALDH10A9. La localisation peroxyosomale a été suggérée par immunodétection pour HvBADH1 (Nakamura *et al.* 1997) et démontrée par une expérience de fusion à la GFP pour AtALDH10A9 (Missihoun *et al.* 2011). Des auteurs soulignent que le fait que le cofacteur de prédilection des ALDH10 serait le NAD⁺ plutôt que le NADP⁺ (Arakawa *et al.* 1990) est cohérent avec une localisation peroxyosomale car la concentration de NAD⁺ est plus élevée dans les peroxyosomes (Oguri *et al.* 2003).

Un certain nombre d'ALDH10, dont PsAMADH2, SIAMADH2, les deux ALDH10 de l'épinard, HvBADH2 ou encore AtALDH10A8 sont dépourvues de tripeptide SKL, et peuvent être localisées dans le cytosol ou les plastes. Ainsi, chez l'épinard, SoBADH1, fortement exprimée, est localisée dans le chloroplaste (Weigel *et al.* 1986). SoBADH2, plus faiblement exprimée, est vraisemblablement adressée au cytosol (Weretilnyk & Hanson, 1989). Chez l'orge, HvBADH2 est vraisemblablement localisée dans le cytosol (Nakamura *et al.* 2001). Concernant Arabidopsis, une étude de la protéine fusionnée à la GFP suggère qu'ALDH10A8 est localisé dans les leucoplastes (Tableau 7) (Missihoun *et al.* 2011). Le fait qu'au sein d'une même espèce coexistent des ALDH10 dont la localisation est différente suggère que les isoenzymes ont possiblement des fonctions spécifiques à chaque compartiment cellulaire. Pour l'instant, une association entre la localisation subcellulaire et la fonction reste à étudier.

Tableau 7 : Localisation subcellulaire de quelques ALDH10. Environ la moitié des ALDH10 portent le tripeptide SKL et sont localisées au niveau du peroxyosome. Les autres sont plastidiales ou cytosoliques. Abréviations : BADH : bêtaïne aldéhyde déshydrogénase. AMADH : aminoaldéhyde déshydrogénase. ND : non déterminé.

Espèce	Isoenzyme	Peptide SKL	Localisation subcellulaire
<i>Oryza sativa</i>	BADH1	Oui	Peroxyosomale (Mitsuya et al. 2009)
	BADH2	Oui	ND, supposée peroxyosomale
<i>Zea mays</i>	AMADH1a	Oui	ND, supposée peroxyosomale
	AMADH1b	Oui	ND, supposée peroxyosomale
	AMADH2	Oui	ND, supposée peroxyosomale
<i>Triticum aestivum</i>	BADH1	Oui	ND, supposée peroxyosomale
	BADH2	Non	Cytosolique
<i>Hordeum vulgare</i>	BADH1	Oui	Peroxyosomale (Nakamura et al. 1993)
	BADH2	Non	Cytosolique (Fujiwara et al. 2008)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ALDH10A8	Non	Leucoplastique ou plastidiale (Missihoun et al. 2011, Zarei et al. 2016)
	ALDH10A9	Oui	Peroxyosomale (Missihoun et al. 2011)
<i>Spinacia oleracea</i>	BADH1	Non	Plastidiale
	BADH2	Non	Cytosolique
<i>Solanum lycopersicum</i>	SIAMADH1	Non	ND
	SIAMADH2	Oui	ND, supposée peroxyosomale
<i>Pisum sativum</i>	PsAMADH1	Oui	ND, supposée peroxyosomale
	PsAMADH2	Non	ND

d. Structure des ALDH10

La structure de certaines ALDH10 a été caractérisée par cristallographie. Les premières à avoir été étudiées sont les deux ALDH10 du pois (PsBADH1 et PsBADH2) (Tylichová *et al.* 2010). La structure de SoBADH1, puis celles de ZmBADH1a et SIBADH1 ont également été élucidées (Díaz-Sánchez *et al.* 2012; Kopečný *et al.* 2013).

Les ALDH10 de structure connue sont dimériques ou tétramériques (Tylichová *et al.* 2010; Díaz-Sánchez *et al.* 2012; Kopečný *et al.* 2013) (Figure 7). Ainsi, SoBADH1 est un

homodimère (Weretilnyk and Hanson 1989), tout comme PsAMADH1, PsAMADH2 (Tylichová *et al.* 2010), ZmAMADH1 et SlAMADH1 (Kopečný *et al.* 2013). Les sous-unités des deux PsAMADHs comportent 503 acides aminés chacune et leur masse moléculaire est de 57 kDa (Tylichová *et al.* 2010).

i. Domaines de la protéine

Les monomères d'ALDH10 comportent chacun un domaine d'oligomérisation, un domaine de fixation du coenzyme NAD(P)⁺, ainsi qu'un canal portant le domaine catalytique (Johansson *et al.* 1998; Gruez *et al.* 2004; González-Segura *et al.* 2009). Le domaine d'oligomérisation, formé de deux longs feuillets β et d'un feuillet β plus court, connecte les deux monomères (Figure 8).

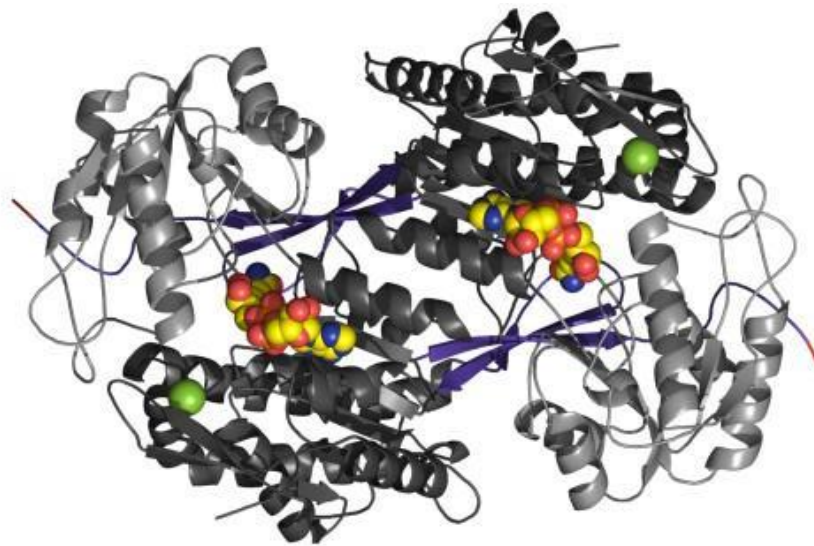


Figure 8 : Structure générale d'un dimère de PsAMADH1. Le domaine catalytique est représenté en gris clair. Le domaine de fixation du coenzyme est représenté en gris foncé. Le domaine d'oligomérisation est représenté en violet. Le NAD⁺ (en couleurs) et l'ion Na⁺ (en vert) sont représentés sous forme de sphères, positionnées dans leurs sites de fixation respectifs. D'après Tylichova et al. 2010.

ii. Site de fixation du coenzyme

Les ALDH10 utilisent comme coenzyme le NAD⁺ ou le NADP⁺. Le site de fixation du coenzyme, situé à l'opposé du domaine d'oligomérisation, est hautement conservé chez les ALDH10. Un tryptophane (Trp161), deux thréonines (Thr242, et Thr159), deux lysines (Lys185 et Lys245), deux sérines (Ser187 et Ser239) et un glutamate en position 188 (Glu188) interagissent avec le NAD⁺ (Tylichová *et al.* 2010) (Figure 9). L'activité des ALDH10 avec le NAD⁺ est près de 20 fois supérieure à celle avec le NADP⁺ (Arakawa *et al.* 1990; Kopečný *et al.* 2013). Glu188 est responsable de la préférence pour le NAD⁺, car il gêne la liaison du groupe phosphate du NADP⁺ (Tylichová *et al.* 2010; Kopečný *et al.* 2013; Muñoz-Clares *et al.* 2014).

La partie adénine du NAD⁺ se place dans une cavité hydrophobe encadrée de deux hélices alpha, le groupe amine étant exposé au solvant. Les atomes d'oxygène du ribose et les oxygènes α et β du groupement phosphate établissent des liaisons hydrogènes avec l'enzyme (Tylichová *et al.* 2010) (Figure 9). La présence du NAD⁺ oriente la cystéine catalytique vers le site de fixation du substrat (Kopečný *et al.* 2013).

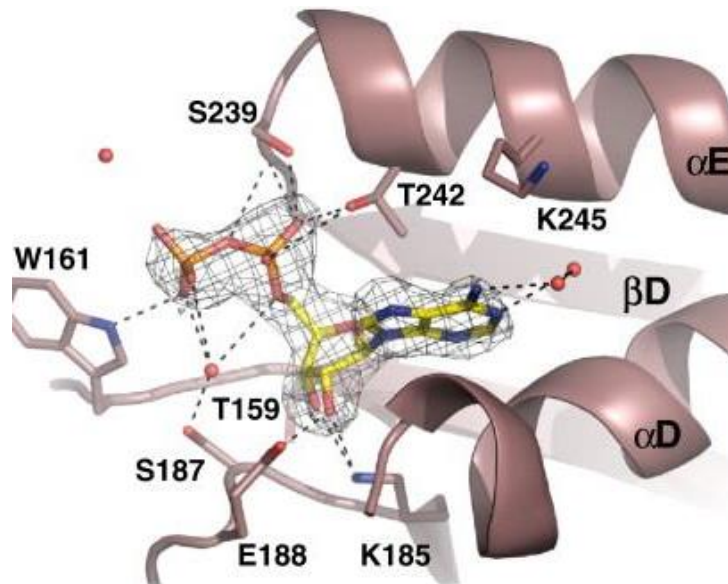


Figure 9 : Détail du site de fixation du NAD⁺ de PsAMADH1, avec une molécule de NAD⁺ représentée à l'intérieur (en couleurs). Les résidus avec lesquels elle interagit sont représentés : Trp161, Glu188, Thr242, Thr159, Lys185, Lys245, Ser187 et Ser239. Les liaisons hydrogènes sont représentées sous forme de traits discontinus. D'après Tylichova et al. 2010.

iii. Site de fixation du cation

A proximité du domaine de fixation du NAD⁺, le site de fixation du cation sodium (Na⁺) (Figure 10) est conservé chez les ALDH10 et d'autres ALDH, animales (Perez-Miller and Hurley 2003) ou bactériennes (González-Segura *et al.* 2009). Il se présente sous la forme d'une cavité formée par les groupes carbonyles de trois résidus : une isoleucine ou une valine, un acide aspartique et une leucine aux positions 28, 99 et 189, respectivement, (Tylichová *et al.* 2010; Kopečný *et al.* 2011, 2013). Cet ion permet vraisemblablement de stabiliser la structure protéique, d'où une perte d'activité de l'enzyme après dialyse durant la purification des protéines (Kopečný *et al.* 2011).

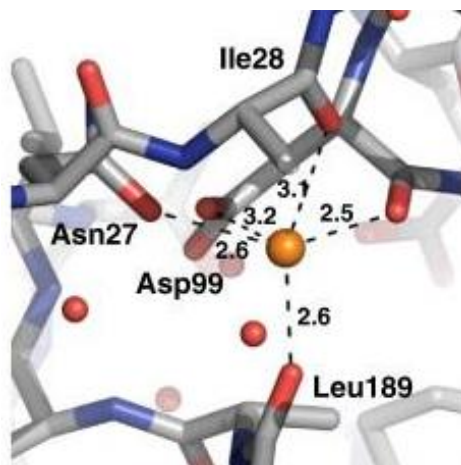


Figure 10 : Détail du site de fixation du cation de PsAMADH1. Le cation Na^+ est représenté sous la forme d'une sphère orangée. Les résidus interagissant avec le cation sont présentés : Ile28, Asp99, Leu189. Les distances en Å entre le cation et les résidus sont indiquées. D'après Tylichova et al. 2010.

iv. Domaine catalytique

Le domaine de fixation du substrat est situé de l'autre côté du dimère par rapport au site de fixation du coenzyme. La partie centrale de chaque domaine est constituée de 5 feuillets β et 4 hélices α . Un canal permet la fixation du substrat (figure 11 A). Chez les PsAMADH, il est formé d'une douzaine de résidus (Tylichová *et al.* 2010) (Figure 11 B). Deux résidus acide aspartique, Asp110 et Asp113, interagissent également avec le substrat. Ils sont responsables de la haute affinité de l'ensemble des ALDH10 pour les aminoaldéhydes (Kopečný *et al.* 2013). Le site actif est formé d'un canal large de 5 à 8 Å et profond de 14 Å chez PsAMADH1 (Kopečný *et al.* 2011). Au fond du canal, trois acides aminés très conservés, Asn162, Cys294 et Glu260, forment ensemble le site actif. Ils interviennent directement dans la catalyse (Kopečný *et al.* 2011). La cystéine 294 catalytique (Cys294) est placée entre le NAD^+ et le site de fixation du substrat (Figure 11 A et B). Elle est directement impliquée dans l'échange d'électrons entre le NAD^+ et le substrat (Wymore *et al.* 2004).

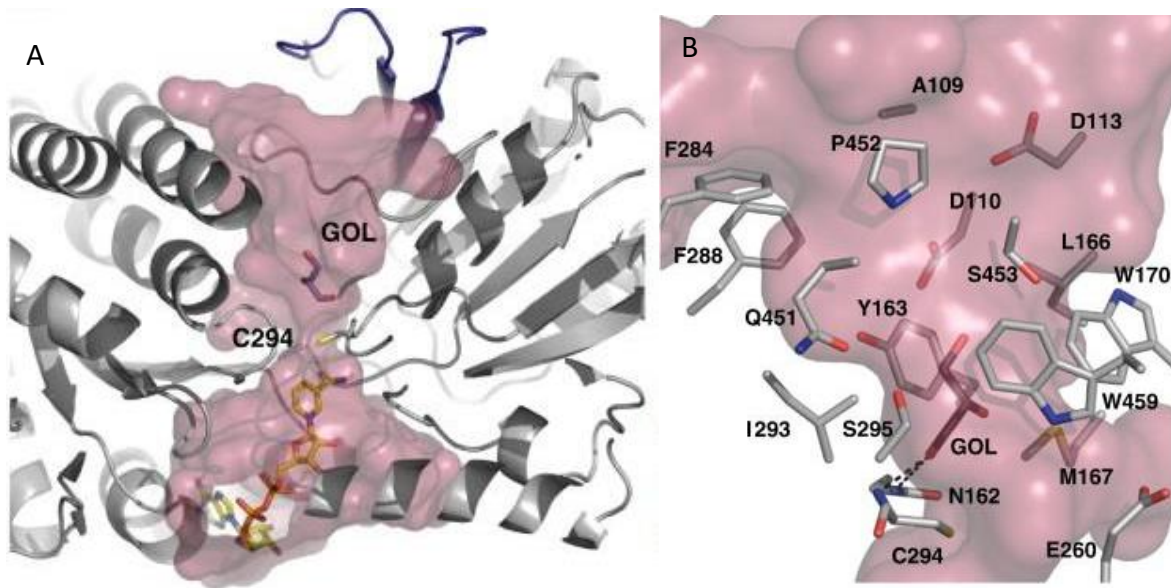


Figure 11 : (A) Canal du substrat de PsAMADH1. Une molécule NAD^+ est représentée dans son domaine de fixation, à proximité de la cystéine site catalytique (C294). (B) Détail du site catalytique de PsAMADH1. Les acides aminés du site catalytique, responsables de l'interaction avec le substrat, sont indiqués, dont Asp110, Asp113, Asn162, Cys294 et Glu260. Abréviations : GOL : glycérol. D'après Tylichova et al. 2010.

v. Fonctionnement enzymatique

La manière dont la réaction se déroule a été proposée à partir de la structure des enzymes. Tout d'abord, une activation nucléophile du substrat par la cystéine catalytique (Cys294) conduit à la formation d'un intermédiaire thiohémiacétal. Ensuite, le transfert d'un hydride au NAD^+ , génère la formation de NADH et d'un thioester, c'est-à-dire un intermédiaire covalent. Enfin, un glutamate conservé active une molécule d'eau, permettant l'attaque nucléophile de la liaison thioester acyl-sulfure, et le relargage de l'acide aminé ainsi formé (Perez-Miller and Hurley 2003; Tylichová *et al.* 2010).

vi. Relations entre structure et spécificité de substrat

Les études des relations structure-fonction des ALDH10 ont permis d'identifier un certain nombre d'acides aminés, variant d'une ALDH10 à l'autre, responsables des différences de spécificité de substrat entre les ALDH10. Le résidu en position 444 influence sur la capacité des ALDH10 à prendre en charge la BAL (Kopečný *et al.* 2013). La présence d'une cystéine comme chez ZmAMADH1a, ou d'une alanine comme chez SoBADH1, élargit le canal de substrat, ce qui permet au groupe triméthylammonium de la BAL de se fixer (Tylichová *et al.* 2010; Kopečný *et al.* 2013). Les deux PsAMADH portent une isoleucine, qui rend plus étroit le canal de fixation du substrat (Kopečný *et al.* 2013). Il en résulte une plus faible affinité pour la BAL

(Kopečný *et al.* 2013). De plus, l'absence de résidu chargé à proximité du groupe amine explique la faible activité des ALDH10 du pois sur la BAL (Tylichová *et al.* 2010).

Le résidu situé en position 288 est crucial pour la spécificité de substrat des ALDH10 (Tylichová *et al.* 2010; Kopečný *et al.* 2013). PsAMADH2, SIAMADH2, ZmAMADH1a et ZmAMADH1b portent un tryptophane à cette position. Il a pour effet de réduire le volume du canal du substrat (Tylichová *et al.* 2010). Il en résulte une meilleure affinité pour les aminoaldéhydes linéaires, comme l'APAL et l'ABAL. A l'inverse, SIAMADH1 et ZmAMADH2 portent une alanine et PsAMADH1 porte une phénylalanine, ce qui explique leur affinité plus élevée pour le TMABAL que pour l'ABAL (Tylichová *et al.* 2010; Kopečný *et al.* 2013).

Le résidu situé en position 453 est important pour la spécificité de substrat des ALDH10. La présence d'une thréonine, comme chez SIAMADH1, élargit le canal du substrat, et le rend moins polaire. Cela permet d'oxyder efficacement une plus grande gamme de substrats (Kopečný *et al.* 2013). C'est le cas des ALDH10 du maïs et de SIAMADH2. A l'inverse, chez PsAMADH2 et les trois ZmAMADH, qui portent une cystéine, et chez PsAMADH1 qui porte une sérine, la spécificité de substrats est plus restreinte.

e. Implication des ALDH10 dans la physiologie de la plante

i. Intervention dans la synthèse de glycine bêtaïne

Les plantes se protègent des stress abiotiques, tels que la déshydratation et les basses températures, par l'accumulation de composés solubles. Parmi eux, la glycine bêtaïne, ou triméthylbêtaïne, est la plus répandue (Hanson and Wyse 1982; Le Rudulier *et al.* 1984). Elle permet d'ajuster le potentiel osmotique du cytoplasme (Meloni *et al.* 2004; Ben Hassine *et al.* 2008), et stabilise les structures quaternaires des protéines ; en particulier les protéines du photosystème II (Papageorgiou and Murata 1995) et la Rubisco (Nomura *et al.* 1998). La glycine bêtaïne est synthétisée à partir de la choline *via* deux réactions enzymatiques. La choline est d'abord oxydée en BAL par la choline monooxygénase (CMO ; EC 1.14.15.7). Ensuite, la BAL est convertie en glycine bêtaïne par les ALDH10 (Figure 12).

L'implication des ALDH10 dans l'oxydation importante de la BAL en glycine bêtaïne en réponse au stress salin ou le manque d'eau a été montrée chez plusieurs espèces, dont l'orge (Ladyman *et al.* 1980; Arakawa *et al.* 1990), la betterave (Hanson and Wyse 1982), l'épinard (Weigel *et al.* 1986), et le palétuvier (*Avicennia marina*) (Hibino *et al.* 2001). D'autres plantes,

comme le riz ou *Arabidopsis*, bien que capables de synthétiser la glycine bêtaïne, ne peuvent l'accumuler de manière importante en réponse au stress. Cette incapacité pourrait être due à la perte d'activité de la CMO (Hibino *et al.* 2002). En effet, une lignée de riz surexprimant la CMO de l'épinard acquiert la capacité d'accumuler la glycine bêtaïne (Shirasawa *et al.* 2006). De plus, il a été montré que ALDH10A9 serait active sur la BAL (Missihoun *et al.* 2011) et que les deux ALDH10 d'*Arabidopsis* sont capables de produire de la glycine bêtaïne. Ainsi, le mutant surexprimant AtALDH10A8 et AtALDH10A9 accumule une quantité supérieure de glycine bêtaïne en réponse au stress salin (Missihoun *et al.* 2015).

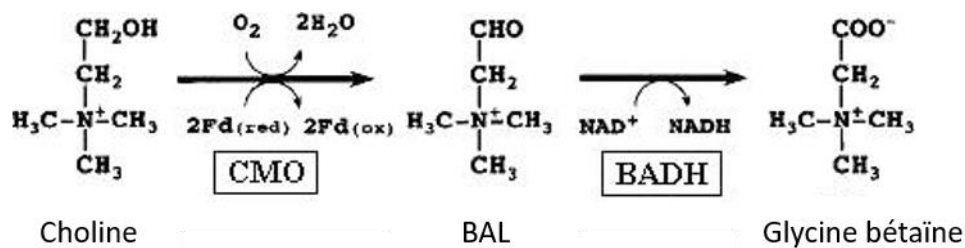


Figure 12 : Voie de biosynthèse de la glycine bêtaïne. Abréviations : CMO : choline monooxygénase. BAL : bêtaïne aldéhyde. BADH : bêtaïne aldéhyde déshydrogénase (ALDH10). Fd : Ferrédoxine. NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide. (D'après Sakamoto et Murata, 2002).

ii. Intervention dans le métabolisme du GABA

Certaines ALDH10, comme chez l'orge et le riz (Nakamura *et al.* 2001; Fujiwara *et al.* 2008), sont spécifiques des aminoaldéhydes linéaires. Elles peuvent être impliquées dans la conversion de l'ABAL en GABA. Le GABA est un acide aminé non protéinogène présent dans l'ensemble du vivant, associé à des fonctions biologiques variées. Il a beaucoup été étudié chez les animaux, où il intervient comme neurotransmetteur. Chez les plantes, il est principalement synthétisé par la décarboxylation du glutamate, catalysée par l'enzyme glutamate décarboxylase (GAD, EC 4.1.1.15) (Shelp *et al.* 1999). Il peut être métabolisé en semialdéhyde succinique par la GABA transaminase (GABA-T, EC 2.6.1.19). Le semialdéhyde succinique peut être ensuite converti en succinate par l'intervention d'une semialdéhyde déshydrogénase (SSADH, EC 1.2.1.16) (Figure 13). Chez la mousse *Physcomitrella patens*, une ALDH21 est impliquée dans cette réaction (Kopečná *et al.* 2017). Ces trois réactions forment ensemble le « GABA shunt » (Shelp *et al.* 1999).

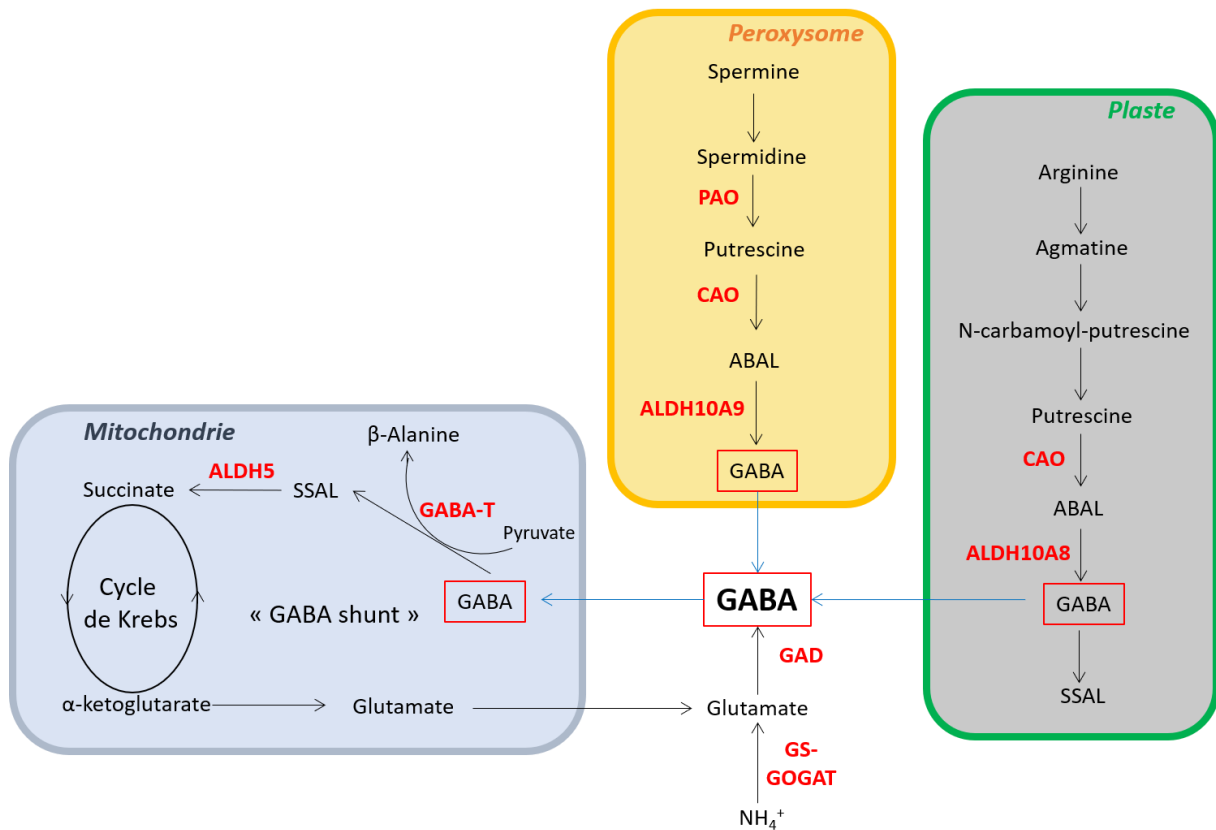


Figure 13 : Métabolisme du GABA chez les plantes. Abréviations : GAD : glutamate décarboxylase. GS-GOGAT : glutamate synthase - glutamate 2-oxoglutarate aminotransférase. GABA-T : GABA transaminase. SSAL : semialdéhyde succinique. ABAL : 4-aminobutyraldéhyde.

Le GABA intervient de différentes manières dans la physiologie de la plante. C'est une molécule signal intervenant notamment dans la croissance du tube pollinique. Chez *Arabidopsis*, le mutant *pollen-pistil-interaction2 (pop2)* est affecté dans la croissance du tube pollinique. Le gène muté chez *pop2* est une GABA-T qui intervient dans l'établissement d'un gradient de GABA le long du pistil, permettant la croissance du tube pollinique (Palanivelu *et al.* 2003). Le GABA joue également un rôle dans le métabolisme de l'azote, notamment son stockage et son transport, et dans l'équilibre entre le carbone et l'azote. Le GABA interviendrait dans la régulation du pH du cytosol, car il peut s'accumuler dans les tissus en réponse à une acidification de ce dernier. Le GABA joue également un rôle dans la protection contre le stress oxydatif et dans la défense contre les insectes (Shelp *et al.* 1999; Bouché and Fromm 2004).

Le GABA possède enfin des propriétés osmoprotectantes. Il peut s'accumuler dans les tissus des plantes en réponse à un stress abiotique, tels que le sel (Kim *et al.* 2007), les températures élevées ou basses, les phytohormones ou encore la stimulation mécanique (Kinnersley and Turano 2000). Cette accumulation se produit principalement par décarboxylation du glutamate,

car la production importante de GABA s'accompagne d'une consommation du stock de glutamate (Wallace *et al.* 1984). Le GABA peut aussi être synthétisé à partir de l'ABAL par les ALDH10. Une intervention des ALDH10 dans la production de GABA en réponse osmotique au stress a été proposée. Ainsi, chez l'orge et le riz, l'expression des *ALDH10* est induite par le sel et le manque d'eau (Oguri *et al.* 2003). Chez *Arabidopsis*, *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* ont été liées à la production importante de GABA en réponse au stress salin (Zarei *et al.* 2016). Les mutants *KO8-2* et *badh*, perte de fonction pour *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9*, respectivement, montrent une sensibilité accrue à la déshydratation et au stress salin (Missihoun *et al.* 2011; Zarei *et al.* 2016), et accumulent moins de GABA en réponse au stress salin (Zarei *et al.* 2016). Ces résultats suggèrent que *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* seraient responsables de la synthèse de GABA dans le plaste et le peroxyosome, respectivement. Le GABA serait ensuite exporté et pourrait intervenir dans le GABA shunt mitochondrial (Figure 13).

iii. Implication dans la résistance au stress

Les ALDH10 peuvent donc être impliquées dans la biosynthèse de plusieurs molécules aux propriétés osmoprotectantes, notamment la glycine bêtaïne, le GABA et la carnitine. Leur rôle dans la réponse au stress osmotique a fait l'objet de nombreuses études. L'expression des *ALDH10* peut être induite par le stress salin, le manque d'eau, et les températures basses ou élevées. Ces propriétés en font des enzymes intéressantes pour l'amélioration des plantes en ingénierie génétique.

L'induction de l'expression des *ALDH10* en réponse au stress salin ou le manque d'eau a été montrée chez plusieurs espèces telles que l'orge (Ishitani *et al.* 1995), l'épinard (Weigel *et al.* 1986; Weretilnyk and Hanson 1989), le sorgho (*Sorghum bicolor*) (Wood *et al.* 1996), le poirier *Pyrus breitschneideri* (Liang *et al.* 2004), la plante halotolérante *Atriplex centralasiatica* (Yin *et al.* 2002) ou encore *Arabidopsis* (Tableau 8), chez qui l'induction de l'expression de *AtALDH10A8* d'*AtALDH10A9* est cependant faible (Missihoun *et al.* 2011). Chez certaines espèces, l'expression des gènes codant pour les différentes isoenzymes n'est pas induite de la même manière. Ainsi, chez le palétuvier, l'expression d'une seule des deux isoenzymes ALDH10 est induite par le stress salin (Hibino *et al.* 2001). Chez le riz, une ALDH10 est inductible (Oguri *et al.* 2003) (Tableau 8), alors que l'autre est exprimé constitutivement dans les feuilles (Chen *et al.* 2008; Fitzgerald *et al.* 2009). Malgré cela, des lignées mutantes RNAi pour l'ALDH10 constitutive deviennent sensibles au stress salin (Niu *et al.* 2008). Chez

Arabidopsis, l'expression de *AtALDH10A8* est induite plus efficacement que celle de *AtALDH10A9*.

L'acide abscissique induit l'expression des *ALDH10* chez certaines espèces, dont l'orge (Ishitani *et al.* 1995), l'amaranthe (Legaria *et al.* 1998), *A. centralasiatica* (Yin *et al.* 2002), et le poirier (Liang *et al.* 2004). L'expression de certaines *ALDH10* peut également être régulée par les températures élevées ou basses. C'est le cas chez *A. centralasiatica* (Yin *et al.* 2002) ainsi que des deux *ALDH10* d'Arabidopsis (Missihoun *et al.* 2011) (Tableau 8). L'expression de *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* est aussi induite par le stress oxydatif (Missihoun *et al.* 2011).

Tableau 8 : Induction par le stress de l'expression des gènes *ALDH10*, selon l'espèce et l'isoenzyme. Modifié d'après (Fitzgerald *et al.* 2009). Abréviations : ABA : acide abscissique.

Espèce	Isoenzyme	Stress	Référence
<i>Spinacia oleracea</i>	SoBADH1	Sel	Weigel et al. 1986; Weretilnyk & Hanson 1989
<i>Hordeum vulgare</i>	Non défini	Sel, ABA	Ishitani et al. 1994
<i>Sorghum bicolor</i>	Les deux ALDH10	Manque d'eau	Wood et al. 1996
<i>Oryza sativa</i>	OsAMADH1	Sel	Nakamura et al. 1997
<i>Amaranthus tricolor</i>	Non défini	Sel, ABA	Legaria et al. 1998
<i>Avicennia marina</i>	AmAMADH1	Sel	Hibino et al. 2001
<i>Atriplex centralasiatica</i>	AcAMADH1	Sel, manque d'eau, froid, ABA	Yin et al. 2002
<i>Pyrus breitschneideri</i>	Non défini	Manque d'eau, ABA	Liang et al. 2004
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtALDH10A8 et AtALDH10A9	Sel, froid, stress oxydatif	Missihoun et al. 2011

iv. Effets de l'expression transgéniques des *ALDH10* sur la résistance au stress

Des plantes transformées avec les *ALDH10* d'espèces accumulatrices de glycine bêtaïne acquièrent la capacité d'accumuler de la glycine bêtaïne à leur tour. Elles deviennent aussi

résistantes à un certain nombre de stress abiotiques (Tableau 9). C'est le cas du tabac exprimant SoBADH1, une ALDH10 de betterave (Rathinasabapathi *et al.* 1994; Russell *et al.* 2002) ou une ALDH10 de la soude (*Suaeda liaotungensis*), une plante halotolérante (Li *et al.* 2003) (Tableau 9). Le riz exprimant les ALDH10 de l'orge, pourtant faiblement active avec la BAL (Fujiwara *et al.* 2008), devient capable d'accumuler la glycine bêtaïne (Kishitani *et al.* 2000). La patate douce (*Ipoema batatas*) exprimant SoBADH1, tout comme Arabidopsis surexprimant une ALDH10 de la plante halophyte *Sesuvium portulacastrum*, acquièrent la capacité d'accumuler de la glycine bêtaïne et deviennent résistantes au manque d'eau et au stress oxydatif (Yang *et al.* 2015). L'expression des gènes impliqués dans la défense contre le stress oxydatif, comme la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, la glutathion réductase, la catalase, ou encore l'ascorbate peroxydase, sont induites plus efficacement par le sel, le méthylviologène et le froid (Fan *et al.* 2012; Yang *et al.* 2015). La tomate exprimant les ALDH10 du sorgho (Moghaieb *et al.* 2000) ou de *A. centralasiatica* (Jia *et al.* 2002) montre également une tolérance accrue au sel (Tableau 9). Chez la carotte (*Daucus carota*), la surexpression d'une de ses propres ALDH10 dans les plastes des feuilles et des racines favorise l'accumulation de glycine bêtaïne à des niveaux comparables à celui des plantes halophytes, et améliore la résistance stress salin (Kumar 2004).

Tableau 9 : Effet de l'expression transgénique des ALDH10 sur la résistance au stress chez les plantes. Modifié d'après Fitzgerald *et al.* 2009.

Espèce transformée	Espèce dont est issue l'ALDH10	Tolérance	Référence
<i>Nicotiana tabaccum</i>	<i>Spinacia oleracea</i>	Sel, chaleur	Liang <i>et al.</i> 1997
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Sorghum sp.</i>	Sel	Moghaieb <i>et al.</i> 2000
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Suaeda liaotungensis</i>	Sel	Li <i>et al.</i> 2003
<i>Daucus carota</i>	(surexpression)	Sel	Kumar <i>et al.</i> 2004
<i>Ipoema batatas</i>	<i>Spinacia oleracea</i>	Sel, froid, stress oxydatif	Fan <i>et al.</i> 2012
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Atriplex hortensis</i>	Sel	Jia <i>et al.</i> 2002
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Sesuvium portulacastrum</i>	Manque d'eau, stress oxydatif	Yang <i>et al.</i> 2015

v. Implication dans la germination

Chez les plantes oléagineuses, comme *Arabidopsis*, le développement précoce repose sur la dégradation d'une réserve de TAG stockée sous forme de corps lipidiques, et ce jusqu'à l'établissement de la photoautotrophie. Les acides gras issus de la dégradation des TAG sont dégradés en acétyl-CoA *via* la β -oxydation. Cet acétyl-CoA est utilisé pour la synthèse de glucose *via* le cycle du glyoxylate et la néoglucogénèse, ce qui permet de fournir à la plante l'énergie nécessaire à son développement, avant l'établissement de la photoautotrophie (Eastmond and Graham 2001).

Chez *Arabidopsis*, une étude a suggéré que le mutant d'insertion *badh*, perte de fonction pour AtALDH10A9, est affecté dans la β -oxydation (Cassin-Ross and Hu 2014). Chez ce mutant, les plantules âgées de 3, 5 et 7 jours conservent une teneur plus importante que le sauvage en acides gras dans leurs tissus, et des corps lipidiques persistants ont été identifiés par microscopie confocale dans les plantules âgées de 7 jours (Cassin-Ross and Hu 2014). Cette rétention de lipides serait due à un défaut dans la β -oxydation. En effet, la réponse du mutant *badh* à l'acide 2,4-dichlorophénoxybutyrique, une molécule convertie en un analogue de l'auxine par la β -oxydation, est réduite. Enfin, comme certains mutants affectés dans la β -oxydation, *badh* est affecté dans la germination (Cassin-Ross and Hu 2014). Ainsi, le taux de germination des graines à l'obscurité est significativement réduit, et il est plus sensible à l'effet inhibiteur de l'acide abscissique sur la germination (Cassin-Ross and Hu 2014).

Ces résultats ont permis de supposer que les ALDH10 pouvaient avoir un rôle dans la β -oxydation. Ils rejoignent les études montrant la forte identité de séquence entre les ALDH10 et les TMABADH humaine et fongique (Rippa *et al.* 2012), qui a permis de suggérer une implication des ALDH10 dans la voie de biosynthèse de la carnitine. Par ailleurs, une accumulation de carnitine en réponse au stress salin légèrement plus importante a été rapportée pour des mutants d'*Arabidopsis* surexprimant *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* (Missihoun *et al.* 2015). Ces différentes études ont ainsi permis de supposer une implication des ALDH10 dans la voie de biosynthèse de la carnitine.

C. Objectifs du travail de thèse

La carnitine est présente dans les tissus des plantes. Cependant, si au regard des données animales et microbiennes ses rôles physiologiques peuvent être nombreux, ils ne sont pas clairement identifiés chez les végétaux. Acquérir des connaissances sur sa voie de biosynthèse pourrait permettre de renforcer certaines hypothèses sur ses fonctions. Celle-ci présente des similitudes avec la voie de biosynthèse des animaux et des levures (Rippa *et al.* 2012). L'identification de la TML et de la γ -butyrobétaine chez les plantes suggère qu'elle requiert des activités enzymatiques comparables. Les enzymes responsables de la biosynthèse de la carnitine ne sont pourtant pas encore identifiées chez les végétaux. Des analyses bioinformatiques ont néanmoins permis de proposer l'intervention des enzymes ALDH10 d'Arabidopsis dans la conversion du TMABAL en γ -butyrobétaine, le précurseur direct de la carnitine (Rippa *et al.* 2012). Cependant, les ALDH10 des plantes sont une famille d'enzymes capables de prendre en charge des substrats variés (Tylichová *et al.* 2010; Kopečný *et al.* 2013). Elles pourraient donc intervenir également dans la production d'autres composés, et ainsi participer à différents processus physiologiques.

L'identification d'acétylcarnitine et d'acylcarnitines dans les tissus végétaux (Bourdin *et al.* 2007; Nguyen *et al.* 2016), ainsi que les mesures d'activités carnitine acyl(acétyl)transférase (McLaren *et al.* 1985; Burgess and Thomas 1986; Gerbling and Gerhardt 1988; Schwabedissen-Gerbling and Gerhardt 1995), montrent que la carnitine intervient dans le métabolisme lipidique chez les plantes, comme chez les animaux et les levures. Ces données indiquent que des enzymes catalysant l'estérification de la carnitine aux acides gras et à l'acétate sont présentes chez les plantes. De plus, l'identification d'activités CPT sur les membranes externe et interne de la mitochondrie suggère la présence possible d'un système de transport de type navette carnitine (Wood *et al.* 1984). Ce système pourrait inclure un transporteur de type CACT. Néanmoins, les enzymes responsables des activités carnitine acyl(acétyl)transférases et CACT ne sont toujours pas identifiées chez les plantes.

Sur la base des données bibliographiques précédemment énoncées, ce travail de thèse poursuit donc trois objectifs :

- Premièrement, la caractérisation *in vitro* des ALDH10 d'Arabidopsis d'un point de vue fonctionnel devrait permettre de formuler des hypothèses quant aux fonctions biologiques possibles de ces enzymes. Leur capacité à prendre en charge différents aminoaldéhydes sera mesurée et comparée à celles des ALDH10 d'autres espèces. Cette

analyse devra permettre de confirmer ou non l'implication possible des AtALDH10 dans la voie de biosynthèse de la carnitine. Elle devra également permettre de proposer d'autres processus physiologiques dans lesquels ces enzymes peuvent être impliquées.

- Ensuite, les mutants perte de fonction pour AtALDH10A8 et AtALDH10A9 déjà disponibles, seront étudiés. Un double mutant, perte de fonction pour les deux enzymes, sera généré et étudié. La caractérisation des différents génotypes fournira des renseignements précieux sur les rôles physiologiques des ALDH10 chez Arabidopsis, et possiblement plus largement chez les plantes. Cela concerne notamment le développement et l'architecture de la plante, la résistance au stress salin, et le métabolisme lipidique. Une quantification de métabolites doit également permettre de rejeter ou de confirmer les hypothèses proposées par la caractérisation *in vitro* des AtALDH10, notamment leur éventuelle implication dans la biosynthèse de la carnitine.
- Enfin, il est essentiel de tirer profit de ce qui est connu chez les animaux et les levures pour approfondir les connaissances au sujet de la physiologie de la carnitine chez les plantes. En particulier, l'outil bioinformatique sera un outil de choix pour rechercher chez les plantes de nouvelles enzymes, potentiellement impliquées dans sa voie de biosynthèse et son activité dans le transport d'acides gras et d'acétate. Une recherche exhaustive de candidats par homologie de séquence sera réalisée dans les bases de données chez l'ensemble des plantes. Un outil utilisant l'homologie structurale sera également utilisé pour rechercher dans le protéome d'Arabidopsis des enzymes dont la structure tridimensionnelle prédite serait homologue à celle des enzymes animales. Cette recherche poursuit deux objectifs : identifier chez les plantes d'une part des enzymes potentiellement liées à la voie de biosynthèse de la carnitine, et d'autre part des enzymes liées à son intervention dans le transport d'acétate et d'acides gras.

II. Matériel et méthodes

A. Matériel

1. Bactéries

La souche bactérienne *Escherichia coli* Stellar™ Competent Cells HST08 (Clontech, Mountain View, Etats-Unis), de génotype *F-*, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *phoA*, $\Phi 80d$ *lacZAM15*, Δ (*lacZYA* - *argF*) *U169*, Δ (*mrr*- *hsdRMS* - *mcrBC*), Δ *mcrA*, λ^- , est utilisée pour l'amplification des plasmides. La souche *E. coli* BL21 (DE3) (New England Biolabs, Ipswich, Royaume-Uni), de génotype (*fhuA2* [*lon*] *ompT gal* (λ *DE3*) [*dcm*] Δ *hsdS* λ *DE3* = λ *sBamHIo* Δ *EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1)* *i21* Δ *nin5*) est utilisée pour l'expression de protéines recombinantes.

2. Plasmides

Le plasmide pGem®-T Easy (Promega, Madison, Etats-Unis) est utilisé pour le clonage des produits d'amplification par réaction en chaîne par polymérase (PCR). Il contient un gène de résistance à l'ampicilline (Figure 14). Il permet de cloner un gène d'intérêt à l'intérieur du gène *LacZ*, codant pour une β -galactosidase. En présence de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside (X-gal) et d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), les colonies bactériennes transformées avec le plasmide prennent une coloration bleue. Si le plasmide est recombiné, les colonies sont de couleur blanche.

Le plasmide pCDFDuet™-1 est utilisé pour l'expression de protéines recombinantes. Il permet l'ajout d'un tag histidine (6*His) en position N-terminale (Figure 15). Il comporte un gène de résistance à la streptomycine.

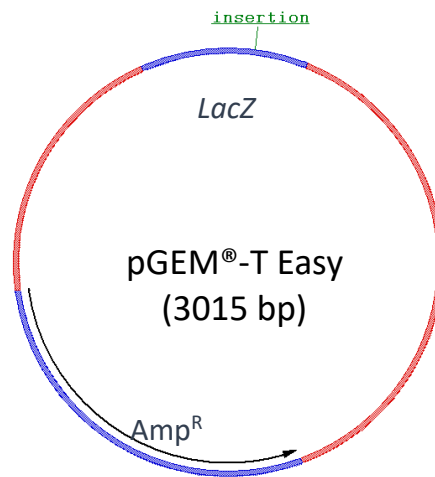


Figure 14 : Carte simplifiée du plasmide pGem®-T Easy. Les positions du gène de résistance à l’ampicilline (Amp^R), du gène *LacZ* (en bleu foncé), et de l’insertion du gène d’intérêt dans le gène *LacZ* (insertion, en vert) sont indiquées.

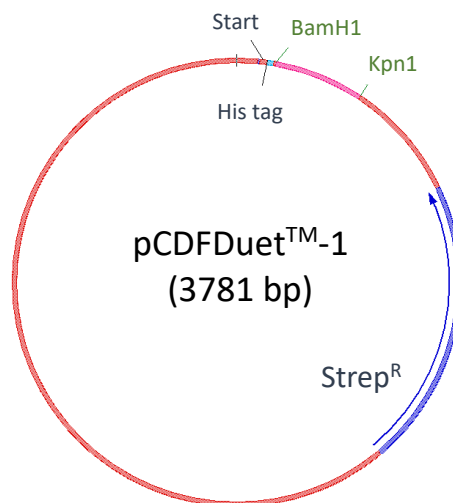


Figure 15 : Carte simplifiée du plasmide pCDFDuet™-1. Les positions du codon initiateur (Start), du tag histidine (His Tag, en bleu clair) et du gène de résistance à la streptomycine (Strep^R, en bleu foncé) sont indiquées. Les sites de restriction BamHI et KpnI, utilisés dans le cadre de cette thèse, sont présentés en vert.

3. Plantes

L’ensemble des expériences réalisées dans le cadre de cette étude sont conduites sur l’écotype Columbia (Col-0) d’*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Antérieurement à ce travail de thèse, le mutant T-DNA homozygote *KO8-2* a été obtenu par autopolinisation de l’hétérozygote SK54056 (Missihoun et al., 2011, Zhao 2014), fourni par la banque NASC (Nottingham Arabidopsis stock center: <http://www.arabidopsis.info/>). Le mutant T-DNA homozygote *badh*

a été obtenu par autopollinisation de l'hétérozygote SAIL_543_H01, fourni par la banque NASC.

4. Amorces pour les PCR

Les amorces sont choisies en utilisant le logiciel Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Elles sont commandées auprès de Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne). Les amorces utilisées dans le cadre de ce travail de thèse sont listées dans le tableau 10.

Tableau 10 : Liste des amorces utilisées.

Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique dans le sens 5' 3'	Séquence cible
LB3	ATACGACGGATCGTAATTTGTCTG	T-DNA de <i>AtALDH10A8</i> chez <i>KO8-2</i>
ZY001	GGTGCACCACGAATCCACGAT	<i>AtALDH10A8</i>
ZY002	GCACAAAGATTTGAACAGACAGC	<i>AtALDH10A8</i>
LB2	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA	T-DNA de <i>AtALDH10A9</i> chez <i>badh</i>
SR124	AGACAGCCTCGTATAGGATGTATATA	<i>AtALDH10A9</i>
SR125	CGTAGTTCCGATAACGATAGATTGAAT	<i>AtALDH10A9</i>
FJ002	GGATCCGATGGCCGGAATTGT	pGem®-T Easy- <i>AtALDH10A8</i> (Zhao, 2014)
ZY022	CCATGACAAGTTACCCATTACTTAGTT	pGem®-T Easy- <i>AtALDH10A8</i> (Zhao, 2014)
10A8-fwd	AGGACGAGGCAATTGAGCTA	cDNA <i>AtALDH10A8</i>
10A8-rev	TCCAAGTTCTCGTCCAAACC	cDNA <i>AtALDH10A8</i>
10A9-fwd	AGGCAATTCAGCTTGCAAAT	cDNA <i>AtALDH10A9</i>
10A9-rev	CTGAGAGCAGTTGACCCACA	cDNA <i>AtALDH10A9</i>
10A9_for2	CTCTTCATCGGCGGTCAATG	cDNA <i>AtALDH10A9</i>
10A9_rev2	GCCCAATCCTTTCCGTTGTT	cDNA <i>AtALDH10A9</i>
10A9_for_3	GAGACGGCAACTCTTCATCG	cDNA <i>AtALDH10A9</i>
10Ap_rev_3	TCTAGCCCAATCCTTTCCGT	cDNA <i>AtALDH10A9</i>
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	pGem®-T Easy (voir texte)
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	pGem®-T Easy (voie texte)

B. Techniques préparatoires

1. Culture et conservation des bactéries

Les bactéries sont cultivées en milieu Luria-Bertani (LB) (10 g l⁻¹ de bactotryptone, 5 g l⁻¹ d'extrait de levure et 10 g l⁻¹ de NaCl), avec 100 µg ml⁻¹ d'ampicilline pour le plasmide pGem®-T Easy ; et 50 µg ml⁻¹ de streptomycine pour le plasmide pCDFDuetTM-1. Les cultures sont réalisées une nuit à 37°C sous une agitation permanente de 200 rotations par minutes (rpm). Les bactéries sont conservées dans du glycérol 20 % (v/v) et stockées à -80°C.

Pour l'obtention de colonies, les bactéries sont étalées sur milieu LB contenant 10 g l⁻¹ d'agar (LB agar), avec 100 µg ml⁻¹ d'ampicilline pour le plasmide pGem®-T Easy ; et 50 µg ml⁻¹ pour le plasmide pCDFDuetTM. Pour les bactéries transformées avec le plasmide pGem®-T Easy, le milieu LB agar contient également 100 µl de X-gal à 2 % et 0,1 M d'IPTG. Les cultures bactériennes sont incubées une nuit à 37°C.

2. Clonage des bactéries

a. Purification des plasmides

L'ADN plasmidique est extrait à partir d'un volume de 5 ml de cultures bactériennes, en utilisant le kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Allemagne) et en suivant les instructions du fournisseur. La concentration et la qualité de l'ADN dans les échantillons sont déterminées au moyen d'un Nano Drop 2000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Etats-Unis). L'absorbance de l'échantillon à 280 nm, 260 nm et 230 nm sont mesurées. Un ratio A260/A280 proche de 1,8 et un ratio A260/A230 proche de 2 indiquent un échantillon d'ADN suffisamment pur. Les échantillons d'ADN sont conservés à -20°C.

b. Amplification par PCR en vue de clonages

Pour les PCR dont les produits sont destinés à être clonés dans un plasmide, la polymérase de haute-fidélité Pfx50TM DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis) est utilisée. Le mélange réactionnel comprend 5 µl de tampon 10X ; 1,5 µl de dNTP (10 mM) ; 10 ng d'ADN ; et 5 unités d'ADN polymérase. La PCR est réalisée dans les conditions suivantes : une phase de dénaturation de 2 minutes à 94°C, suivie de 35 cycles comprenant chacun une phase de dénaturation de 15 secondes à 94°C, d'une hybridation de 30 secondes à une température

variable en fonction de la séquence des amorces, et une élongation de 30 à 60 secondes à 68°C. Elle comprend pour finir une élongation finale de 5 minutes à 68°C.

c. Digestion et ligation

Les digestions enzymatiques sont réalisées dans un volume réactionnel de 30 µl, contenant approximativement 3 µg d'ADN plasmidique, 3 µl de tampon approprié, et 2 unités d'enzyme de restriction par µg d'ADN. Les échantillons sont incubés 2 heures à la température adéquate. Les ligations sont réalisées en utilisant le kit T4 DNA Ligase (Roche Life Science, Penzberg, Allemagne). Le vecteur ouvert et l'insert sont mis en présence dans un ratio 3:1, dans un volume de 20 µl contenant 2 µl de tampon approprié et la 1 unité de T4 DNA Ligase par µg de plasmide. La ligation est réalisée à 16°C durant 16 heures.

d. Electrophorèse

Les acides nucléiques issus des amplifications par PCR ou des digestions enzymatiques sont analysés après migration sur un gel contenant 1 % d'agarose (m/v). Le gel est élaboré à partir du TAE 0,5 X (20 mM trishydroxyméthylaminométhane (Tris) acétate et 1 mM d'éthylènediaminetétraacétique (EDTA) à pH = 8. Du bromure d'éthidium est rajouté à une concentration de 0,15 µg ml⁻¹. Un tampon de charge « Loading Dye Buffer 6X » (New England Biolabs, Ipswich, Royaume-Uni) est ajouté aux échantillons avant dépôt sur le gel. La migration est réalisée dans un tampon TAE 0,5 X sous une tension de 100 V. La taille des fragments d'acides nucléiques est déterminée en utilisant le marqueur de taille Smart Ladder (Eurogentec, Seraing, Belgique).

e. Transformation

Pour la transformation des bactéries compétentes, les bactéries sont mises en présence de 5 ng de plasmide, soit 2 µl. Après 20 minutes sur glace, les bactéries sont transformées par choc thermique à 42°C pendant 45 secondes pour les HST08 ; et 15 secondes pour les BL21 (de3), puis replacées sur glace pendant 2 minutes. 1 ml de milieu super optimal broth with catabolic repressor (SOC), constitué de 0,5 % d'extrait de levure (m/v), 2 % de tryptone (m/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄ et 20 mM glucose, est ensuite ajouté. Les cultures sont incubées 1 heure à 37°C sous agitation à 200 rpm avant d'être étalées sur milieu LB agar.

3. Culture des plantes et préparation du matériel végétal

a. Culture *in vitro*

Les graines sont stérilisées sous une hotte à flux laminaire horizontal. Elles sont immergées en agitation durant 3 minutes dans 1 ml d'une solution d'éthanol à 70 % contenant 0,05 % (m/v) de sodium dodécyl sulfate (SDS) ; puis rincées avec 1 ml d'éthanol à 95 % durant une minute. Elles sont ensuite séchées sous hotte sur un papier Watman préalablement autoclavé. Les graines sont semées en conditions stériles sur boîte de Petri, sur un milieu Murashige & Skoog, (M5524 Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis) (Murashige and Skoog, 1962), ajusté à un pH 5,8 avec du KOH, et solidifié avec 8 % (m/v) d'agar (A1296 Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis). Elles sont placées à 4°C durant 4 jours pour stratification. Les boîtes de Pétri sont transférées en armoire phytotronique à 24°C, et les plantules sont cultivées avec une photopériode de 16 heures, sous un éclairage de 150 μmol de photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, et une hygrométrie de 70 %.

b. Culture en serre

Les graines d'*Arabidopsis* sont semées sur terreau horticole Floradur (Hortalis, France), dans des pots de 7*7*11 cm, puis stratifiées à 4°C durant 4 jours. Les plantes sont cultivées en serre avec une photopériode de 16 heures sous une lumière de 400 μmol de photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, une température de 24°C et un taux d'hygrométrie de 55 %. Les graines sont récoltées sur les plantes matures sèches, avec les siliques déhiscentes.

c. Culture en conditions de stress salin

Pour étudier l'impact de la salinité sur la croissance de la plante, à partir de 14 jours après germination, les plantes cultivées en pot sont arrosées tous les deux jours avec 100 ml d'eau (pour les plantes de contrôle), ou 100 ml de solution contenant 50 ; 75 ou 100 mM NaCl. Le traitement est poursuivi durant 14 jours. Pour étudier l'impact de la salinité sur la teneur en GABA, γ -butyrobétaïne et carnitine, les plantes âgées de 5 semaines sont arrosées tous les deux jours avec 150 ml d'eau (pour les plantes de contrôle), ou 150 ml de solution contenant une solution de NaCl à 150 mM. Le traitement est poursuivi durant une semaine.

d. Croisements

Le double mutant *KO8-2 badh* est obtenu par croisement des simple mutants *KO8-2* et *badh* homozygotes. Le croisement est réalisé sur des fleurs encore fermées, avant l'autofécondation. Les étamines de l'un des deux parents sont mises en contact avec le stigmate de l'autre parent, de manière à y déposer quelques grains de pollen. Ce premier croisement génère des double hétérozygotes. L'autopollinisation des double hétérozygotes permet d'obtenir 1/16 de double mutants homozygotes *KO8-2 badh*.

e. Dessiccation

Pour mesurer la masse de matière sèche, le matériel végétal est congelé dans l'azote liquide, puis séché durant une nuit dans un lyophilisateur PowerDry LL1500 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Etats-Unis).

4. Extractions d'acides nucléiques de plantes

a. Extraction d'ADN génomique

Les extractions rapides d'ADN génomique de plantes sont réalisées en broyant une feuille jeune de rosette par plante dans un tube Eppendorf, en utilisant un cône adapté stérile. 400 µl de tampon d'extraction (Tris HCl 200 mM pH 7,5 ; NaCl 250 mM, EDTA 25 mM et 0,5 % de SDS) sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite centrifugés 1 minute à 15 700 g. 300 µl d'isopropanol sont ajoutés à 300 µl de surnageant. Les échantillons sont laissés 2 minutes à température ambiante, puis centrifugés 5 minutes à 15 700 g. Les surnageants sont retirés, et les culots sont séchés à 37°C avant d'être resuspendus dans 100 µl de tampon TE (10 mM de Tris et 1 mM d'EDTA). Les échantillons d'ADN sont conservés à -20°C.

b. Extraction d'ARN totaux

Approximativement 30 mg de feuilles caulinaires, feuilles de rosette, boutons floraux ou plantules, congelées dans l'azote liquide, sont broyées dans un mortier préalablement refroidi à l'azote liquide, à l'aide d'un pilon. Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit RNEasy® plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Allemagne), en suivant les instructions du fournisseur. Une étape de digestion de l'ADN par une DNase est incluse, en utilisant le kit RNase free DNase set (Qiagen, Hilden, Allemagne). La concentration et la qualité des ARN dans les échantillons sont déterminées au moyen d'un Nano Drop 2000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Etats-

Unis). L'absorbance de l'échantillon à 280 nm, 260 nm et 230 nm sont mesurées. Un ratio A260/A280 et un ratio A260/A230 proches de 2 indiquent un échantillon d'ARN suffisamment pur. Les échantillons d'ADN sont conservés à -20°C. Les échantillons d'ARN sont conservés à -80°C.

5. Amplifications par PCR

a. Génotypage par PCR

Les PCR pour le génotypage des plantes sont réalisées dans un milieu réactionnel contenant 2,5 µl de tampon 10X approprié, 0,5 µl de dNTP à 10 mM, 0,3 µL de chaque amorce à 20 µM, 0,5 µl de Taq polymérase (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis) et 0,5 µl d'ADN. Dans le cadre de cette thèse, toutes les PCR de génotypage sont réalisées dans les mêmes conditions. L'ADN subit une phase initiale de dénaturation à 94°C pendant 2 minutes. Ensuite, 35 cycles d'amplification sont réalisés. Chaque cycle comprend une phase de dénaturation de 20 secondes à 94°C ; une phase d'hybridation de 20 secondes à 54°C ; ainsi qu'une phase d'élongation de 40 secondes à 72°C.

b. RT-PCR quantitative

Les ADN complémentaires (ADNc) sont synthétisés à partir de 2 µg d'ARN totaux de plantes. La transcription inverse est réalisée avec la transcriptase inverse RevertAid reverse transcriptase (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Etats-Unis). 0,5 µg d'oligo(dT)₁₈, sont ajoutés aux échantillons d'ARN. La transcription inverse est réalisée dans un volume de 20 µl contenant 4 µl de tampon de réaction 5X, 20 unités de l'inhibiteur de RNase Thermo ScientificTM RNase Inhibitor, 2 µl de mélange de dNTP et 200 unités de transcriptase inverse.

Les transcrits sont amplifiés par PCR quantitative en temps réel, sur des plaques de 396 puits. Les échantillons d'ADNc sont dilués 20 fois. Chaque puits contient un volume final de 10 µl, dont 4,6 µl de SYBR Green (Roche Life Science, Penzberg, Allemagne), 20 ng (soit 2 µl) d'ADNc et 0,5 µl de mélange d'amorces sens et antisens (10 pmol µl⁻¹). La PCR est réalisée selon un programme incluant 45 cycles, comprenant chacun 10 secondes à 95°C, 10 secondes à 60°C et 10 secondes à 72°C. Il se termine par une augmentation progressive de la température de 65°C à 97°C. Les valeurs de Cycle Threshold (CT) sont calculées par le logiciel LightCycler 480 (Roche Life Science, Penzberg, Allemagne). Ces valeurs sont comparées à celles des gènes

de référence *EFl α* ou *APT1*, parmi 5 gènes de référence testés. L'expression des gènes étudiés est calculée comme suit :

$$EE^{CT}/ER^{CT}$$

Avec EE : efficacité du couple d'amorces du gène étudié ; ER : efficacité du couple d'amorces du gène de référence ; CT : crossing threshold.

6. Extraction, quantification et purification de protéines

a. Expression des protéines recombinantes

L'expression des protéines recombinantes est induite dans une culture bactérienne de volume variant de 5 ml à 1 l de LB liquide, contenant 50 mM de streptomycine, sous une agitation constante de 200 rpm. L'induction est réalisée en ajoutant 0,2 mM d'IPTG durant la phase de croissance exponentielle ($DO_{600} = 0,4$) à une température de 25°C. Les cultures sont ensuite incubées 4 heures en agitation à 200 rpm.

b. Extraction et purification de protéines bactériennes

Les cultures bactériennes sont centrifugées et le surnageant est éliminé. Les culots bactériens sont repris dans 5 ml de solution de Tris HCl 100 mM (pH 7,5). Le cocktail d'inhibiteur de protéases Pefabloc SC (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis) est ajouté à une concentration de 0,1 mM. Les bactéries sont lysées sur glace par sonication au moyen d'un sonicateur Vibra-Cell (Sonics & Material, Newtown, Etats-Unis), et les échantillons sont centrifugés 20 minutes à 4°C à 10 000 g. Le surnageant est prélevé et centrifugé 30 minutes à 20 000 g à 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Les protéines recombinantes comportant un tag histidine N-terminal (6*His), sont purifiées à partir des protéines bactériennes sur une colonne de nickel NTA sepharose (Qiagen, Hilden, Allemagne), en suivant les instructions du fournisseur. Les protéines sont conservées à -20°C.

c. Extraction de protéines végétales

Les graines ou les plantules, congelées dans l'azote liquide, sont placées dans un mortier préalablement refroidi à l'azote liquide et réduites en poudre avec un pilon. Les échantillons sont resuspendus dans un tampon contenant 150 mM de Tris HCl pH 9,0. Les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 10 000 g à 4°C. Les protéines végétales sont conservées à -20°C.

d. Identification des protéines

5 ml de culture sont centrifugés 10 minutes à 10 000 g, puis repris dans 50 µl de tampon Laemmli 4X (2,5 ml de Tris HCl 1 M pH 6,8 ; 4 ml SDS 20 % ; 1 ml de 2-mercaptoéthanol ; 2,5 ml de glycérol 80 % et 4 mg de bleu de bromophénol), chauffés 10 minutes à 100°C, et centrifugés 10 minutes à 10 000 g. La migration des protéines est réalisée au moyen d'une électrophorèse sur gel SDS-PAGE. Le gel de concentration contient 1,25 ml de Tris HCl 0,5 M pH 6,8, 50 ml de SDS 10 %, 667 µl d'acrylamide 30 %, 50 µl d'ammonium persulfate (APS) et 10 µl de tétraméthyléthylènediamine (TEMED), complété à 5 ml avec de l'eau. Le gel de séparation contient 3,33 ml d'acrylamide 30 % ; 2,5 ml de Tris 1,5 M pH 8,8 ; 100 µl de SDS 10 %, 100 µl d'APS et 10 µl de TEMED, complété à 10 ml avec de l'eau. Pour l'identification des protéines par SDS-PAGE, 10 µl d'échantillons sont déposés sur le gel. Une première migration est réalisée à 90 V. Une fois les échantillons dans le gel de séparation, une seconde migration à 150 V, avec une intensité de 25 mA est réalisée. Le gel est ensuite coloré à l'aide du réactif Coomassie Brilliant Blue R250 (Bio-Rad, Hercules, Etats-Unis) durant une heure, puis décoloré dans une solution contenant 40 % de méthanol et 10 % d'acide acétique durant 4 heures. La taille des protéines est déterminée en utilisant le marqueur de taille PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Etats-Unis).

7. Extraction du GABA, de la γ -butyrobétaine et de la carnitine

Le GABA, la γ -butyrobétaine et la carnitine totale contenus dans les tissus végétaux sont extraits selon la méthode mise au point par notre laboratoire. Les échantillons végétaux (entre 20 et 50 mg de matière fraîche) sont broyés dans l'azote liquide au moyen d'un mortier et d'un pilon, puis resuspendus dans 500 µl de solution méthanol eau (8:2 v/v). Les standards internes deutérés de GABA (GABA d6) et de carnitine (L-carnitine d3) sont fournis par Sigma-Aldrich (références C0158 et 614487, respectivement). Le standard de γ -butyrobétaine (γ -butyrobétaine d9) est fourni par CDN Isotopes (D-6789, Québec, Canada). Ces standards sont ajoutés à une concentration finale de 2, 5 et 10 ng mg⁻¹ matière sèche, respectivement. L'échantillon subit ensuite un traitement aux ultrasons durant 10 secondes, est incubé 30 minutes à 65°C, puis centrifugé 10 minutes à 16 000 g à 4°C. Le surnageant est évaporé à 40°C sous un flux d'azote gazeux. Une phase de précipitation des protéines est ensuite réalisée. Pour cela, le culot est d'abord resuspendu dans 500 µl d'une solution acétonitrile/méthanol 3:1 (v/v), puis 20 minutes à -20°C. L'échantillon est centrifugé 15 minutes à 8 000 g, puis séché sous un flux d'azote gazeux.

8. Extraction d'acides gras et de lipides

Les contenus en acides gras de 50 graines ou plantules sont transméthylés 90 minutes à 85°C dans une solution de méthanol avec 5 % HCl, avec 300 µl de toluène comme cosolvant (Li-Beisson et al. 2013). L'acide heptadécanoïque (C17:0) (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis) est utilisé comme standard interne. Après évaporation, les esters d'acides gras sont extraits dans l'heptane.

Les lipides sont extraits à partir de 50 mg de plantules âgées de 4 jours. Le matériel végétal est broyé durant 5 minutes à 4000 rpm dans 1 ml de chloroforme/méthanol/eau (8:4:3, v/v/v) à l'aide d'un broyeur Precellys® (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France). La phase liquide est prélevée et séchée à l'azote gazeux, puis resuspendue dans 300 µl d'isopropanol. Les échantillons sont ensuite centrifugés 5 minutes à 8000 rpm.

C. Techniques analytiques

1. Génotypage par PCR

Les plantes double hétérozygotes et doubles homozygotes *KO8-2 badh* sont identifiées au moyen d'un génotypage par PCR. Les amorces ZY001, ZY002 et LB3 sont utilisées pour suivre le T-DNA de l'allèle *KO8-2*. ZY001 et ZY002 reconnaissent des séquences du gène *AtALDH10A8*. LB3 reconnaît une séquence située sur la bordure gauche du T-DNA. ZY001 et LB3 permettent de générer un amplicon de 550 pb pour l'allèle *KO8-2* (portant le T-DNA), et les amorces ZY001 et ZY002 permettent de générer un amplicon de 700 pb pour l'allèle sauvage. De la même manière, les amorces SR124, SR125 et LB2 sont utilisées pour suivre le T-DNA de l'allèle *badh*. SR124 et SR125 reconnaissent des séquences du gène *AtALDH10A9*. LB2 reconnaît une séquence située sur la bordure gauche du T-DNA. Les amorces SR124 et SR125 permettent de générer un amplicon de 500 pb pour l'allèle sauvage, et les amorces SR124 et LB2 permettent de générer un amplicon de 200 pb pour l'allèle *badh* (portant le T-DNA). Les plantes homozygotes sont identifiées au moyen d'une électrophorèse sur gel d'agarose. Seules les plantes donnant lieu à une amplification de fragment de 550 paires de bases pour *AtALDH10A8* et 200 paires de bases pour *AtALDH10A9* sont conservées.

2. Activités enzymatiques

L'activité *in vitro* des AtALDH10 recombinantes ou des extraits de protéines végétales solubles totales est déterminée en dosant la conversion du NAD⁺ en NADH. Pour cela, l'absorbance à 340 nm est mesurée au moyen d'un spectrophotomètre ($E_{340} \text{ NADH} = 6,62 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). L'activité des AtALDH10 recombinantes est mesurée dans un tampon réactionnel contenant 3 µl d'enzyme purifiée, 150 mM de tampon Tris-HCl de pH variable (7,0 à 9,0), 1 mM de NAD⁺, et une concentration variable de substrats, dans un volume final de 2 ml. L'activité ALDH10 des extraits de protéines végétales solubles totales est mesurée dans un milieu réactionnel de 2 ml, contenant 150 mM de tampon Tris-HCl (pH = 9), 2 mM de NAD⁺, 300 µl d'extrait de protéines solubles, et 1 mM de substrat (ABAL ou TMABAL). Pour les mesures d'activités enzymatique à un pH supérieur à 9,0, un tampon glycine-NaOH 150 mM est utilisé à la place du tampon Tris-HCl. La BAL est fournie par Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne, référence B3650). L'ABAL, l'APAL, et le DMABAL sont préparés à partir de leur diéthylacétals, fournis par Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne, références A44150 et A8597). Les diéthylacétals du TMABAL, du DMABAL et du TMAPAL et les diéthylacétals carbonates du GBAL et du GPAL sont synthétisés au centre de recherches de la région de Hanà (Olomouc, République Tchèque). Les diéthylacétals sont hydrolysés 10 minutes dans 0,2 M de HCl à 100°C. A partir des cinétiques réalisées avec des concentrations différentes de substrats, les paramètres enzymatiques K_m et V_{max} des enzymes sont calculés au moyen du logiciel GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Etats-Unis). Pour les cas où aucune inhibition par le substrat n'est observée, les paramètres enzymatiques sont déterminés en utilisant l'équation de Michaelis-Menten. Pour tenir compte d'une inhibition par le substrat, les données sont analysées au moyen d'une régression non linéaire en utilisant l'équation de Michaelis-Menten incluant des paramètres permettant de tenir compte d'une inhibition partielle par le substrat :

$$V = V_{max} [S] / (K_m (1 / (1 + \beta [S] / K_i)) + [S] ((1 + [S] / K_i) / (1 + \beta [S] / K_i)))$$

Avec V: vitesse de réaction, V_{max} : vitesse de réaction maximale, [S] : concentration de substrat, K_m : concentration de substrat à la moitié de la vitesse maximale, K_i : constante d'inhibition par le substrat, β : facteur décrivant l'effet de l'inhibition par le substrat sur V_{max} .

L'activité de la protéine NP_188773.1 recombinante a été étudiée dans les mêmes conditions de réaction que celles utilisées pour caractériser la BBD humaine (Lindstedt and Lindstedt 1970; Leung *et al.* 2010). La réaction a été réalisée dans 1 ml de volume réactionnel contenant 50 mM de tampon phosphate pH = 7, 10 mM d'ascorbate de sodium, 20 mM de chlorure de

potassium, 2 mM de sulfate de fer et 3 mM de 2-oxoglutarate. Trois concentrations de substrat γ -butyrobétaine ont été testées : 10, 100 et 1500 ng ml⁻¹, et une quantité variable d'enzyme purifiée ou de protéines bactériennes totales a été ajoutée : de 0 à 100 μ g ml⁻¹. Le mélange est incubé à température ambiante durant 16 ou 48 heures, et la carnitine présente dans l'échantillon est quantifiée.

3. Quantification du GABA, de la γ -butyrobétaine et de la carnitine

La quantification du GABA, de la γ -butyrobétaine et de la carnitine sont réalisées en utilisant un système de couplage Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS Systems (Agilent Technologies, Santa Clara, Etats-Unis). La séparation des composés est réalisée au moyen d'une HPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies, Santa Clara, Etats-Unis), sur une colonne Hilic (150 mm x 3 mm) de KinetexTM avec des particules de 2,6 μ m (Phenomenex). Le gradient d'éluion utilise une solution d'acétate d'ammonium à 7,5 mM (solution A) et de méthanol pur (solution B) comme phase mobile. La phase mobile contient initialement 30 % de solution A et 70 % de solution B. Après 12 minutes, elle contient 50 % de solution A et 50 % de solution B. Après 20 minutes, elle contient 60 % de solution A et 40 % de solution B. Le flux est de 0,6 ml min⁻¹ et 20 μ l d'échantillons sont injectés. L'énergie de collision est de 20 eV. Les transitions utilisées pour les quantifications sont les suivantes: 87 et 43,1 pour le GABA, 87,1, 60,2 et 58,1 pour la γ -butyrobétaine, et 103, 85 et 60,1 pour la carnitine.

4. Analyse et quantification des acides gras et des lipides

Les acides gras sont séparés par chromatographie en phase gazeuse avec détection d'ionisation par flamme (GC-FID) (Shumadzu, Kyoto, Japon) en utilisant une colonne polaire BPX70 (30 m x 0,25 mm avec des particules de 0,25 μ m) (SGE Analytical Science, Milton Keynes, Royaume-Uni). La température du four est de 120°C pendant 2 minutes, et augmente ensuite de 8°C min⁻¹ jusqu'à 250°C. Cette température est maintenue durant 2 minutes. Des échantillons d'acides gras standards ont été passés préalablement sur la colonne pour déterminer le temps de rétention pour chacun d'eux. Les acides gras sont identifiés par leur temps de rétention et les aires des pics correspondants sont calculées.

Les lipides sont séparés et quantifiés par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse quadrupôle/temps de vol (HPLC-QTOF), à l'aide d'une HPLC 1290 et un spectromètre de masse Agilent 6538 (Agilent Technologies, Santa Clara, Etats-Unis) sur une

colonne C18 Hypersil Gold (100 mm x 2,1 mm, avec des particules de 1,9 μm) (ThermoFischer, Waltham, Etats-Unis) à 50°C. Le gradient d'élution utilise une solution d'acétonitrile/eau (60:40, v/v) avec 10 mM de formate d'ammonium et 0,1 % d'acide formique (solution A) et une solution d'isopropanol/acétonitrile/eau (90:10:1, v/v/v) avec 10 mM de formate d'ammonium et 0,1 % d'acide formique (solution B) comme phase mobile. La phase mobile contient initialement 68 % de solution A, puis 60 % après 2 minutes, 55 % après 8 minutes, 50% après 10 minutes, 40% après 16 minutes, 30% après 22 minutes, 20% après 28 minutes, et enfin 100 % de solution B après 35 minutes et durant 5 minutes. A la fin, la colonne est rééquilibrée 10 min par 68 % de solution A et 32 % de solution B. Le flux est fixé à 0,25 ml min^{-1} et 2 μl d'échantillon sont injectés. La température, le fragmenteur et le skimmer sont fixés à 350°C, 150 V et 65 V, respectivement. Les ions parents sont fragmentés avec une énergie de collision de 35 eV en mode positif. Les lipides de l'échantillon sont identifiés sur la base de leurs ions parents et de leurs ions fils au moyen des bases de données LipidBlast (Kind *et al.* 2013) et Lipid Match (Koelmel *et al.* 2017).

5. Quantification de l'amidon

L'amidon est dosé en utilisant le kit Total Starch Assay (AA/AMG) (Megazyme K-TSTA-50A). Le culot obtenu après l'extraction des protéines solubles est resuspendu dans une solution contenant 600 μl d' α -amylase (sodium acétate pH 4,8, α -amylase 1600 unités ml^{-1} (30:1, v/v). Les échantillons sont incubés 30 minutes à 100°C de manière à hydrolyser l'amidon en maltodextrines. 20 μl d' α -amylglucosidase (200 unités ml^{-1}) sont ensuite rajoutés et les échantillons sont incubés 30 minutes à 50°C, afin d'hydrolyser les maltodextrines en D-glucose. Les échantillons sont centrifugés (5 minutes à 13000 rpm), puis 3 ml de glucose oxydase peroxydase (GOPOD) sont ajoutés. Les échantillons sont alors incubés 20 minutes à 50°C, puis centrifugés. La GOPOD convertit le glucose en quinonéimine. Ce composé est dosé par mesure de l'absorbance à 510 nm en utilisant un spectrophotomètre.

6. Quantification des protéines

Les protéines dans les extraits protéiques ou les enzymes purifiées sont quantifiées par dosage de Bradford (Bradford, 1976) en utilisant le réactif Bradford Reagent (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis). Une gamme de concentration de protéine bovine serum albumine (BSA, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Etats-Unis) est réalisée pour déterminer le coefficient d'extinction molaire.

III. Résultats

A. Analyse de la fonctionnalité des enzymes ALDH10A8 et ALDH10A9 d'Arabidopsis

Une première étude a été menée pour déterminer dans quelles voies métaboliques les AtALDH10 pourraient être impliquées. Les séquences protéiques de AtALDH10A8 et AtALDH10A9 ont été comparées à celles des ALDH10 d'autres espèces de plantes qui ont déjà été caractérisées fonctionnellement. La comparaison des séquences a permis de proposer des aminoaldéhydes sur lesquels elles pourraient être actives. Ensuite, les AtALDH10 ont été clonées en système bactérien, surexprimées et purifiées. Leur capacité à prendre en charge plusieurs aminoaldéhydes a été étudiée *in vitro* pour confirmer les hypothèses sur leur fonctionnalité. Cette étude a permis de proposer des rôles biologiques possibles pour les AtALDH10.

1. Etude des séquences des ALDH10 d'Arabidopsis

Plusieurs études ont permis de connaître la relation entre la séquence, la structure tridimensionnelle et la fonction chez les ALDH10 de plantes. Les deux ALDH10 du pois (PsAMADH1 et PsAMADH2) (Tylichová *et al.* 2010), les deux ALDH10 de la tomate (SIAMADH1 et SIAMADH2), et les trois ALDH10 du maïs (ZmAMADH1a, ZmAMADH1b et ZmAMADH2) (Kopečný *et al.* 2013) ont ainsi été caractérisées. Les acides aminés intervenant dans la fixation du coenzyme NAD⁺, du cation Na⁺, et du substrat, sont identifiés. Les résidus responsables de la spécificité de substrat de ces ALDH10 sont également décrits (Tylichová *et al.* 2010; Kopečný *et al.* 2013). Un alignement des séquences protéiques de AtALDH10A8 et AtALDH10A9 avec les ALDH10 des autres espèces a été réalisé (Figure 16). En s'appuyant sur ces études, les résidus importants pour la fonctionnalité des AtALDH10 ont été identifiés. Ils ont ensuite été comparés à ceux des ALDH10 des autres espèces de manière à proposer des hypothèses quant à leur spécificité de substrat. L'ensemble de l'analyse est basée sur la numérotation des acides aminés de PsAMADH1 (Tylichová *et al.* 2010).

Val30

AtALDH10A8 1 MAI---PMPTRQLFIDGIEWREPILKKRIPVNPATEEVIGDIPAAATEDVDVAVNAARRA
 AtALDH10A9 1 MAI---TVPRRQLFIGGQWTEPVLKRTLPVNPATEDIIGYIPAATSEDEVLEAVEAARKA
 PsAMADH1 1 MAI---TVSSRQLFIDGIEWRVPILNKRIPIINPSTENIIGDIPAAATKEDVDLAVDAAKRA
 PsAMADH2 1 MDI---PIPTRQLFINGDWKAPVLNKRIPVNPATQNIIGDIPAAATKEDVDVAVAAAKTA
 ZmAMADH1a 1 MASP-AMVPLRQLFVDGIEWRPPAQGRRLPVNPTEAHIGEIPAGTAEDVDVAVAARRAA
 ZmAMADH1b 1 MASP-AMVPLRQLFVDGIEWRPPAQGRRLPVNPTEAHIGEIPAGTAEDVDVAVAARRAA
 ZmAMADH2 1 MAPP-QTI PRRLFIGGAWREPCLGRRRLPVNPATEATIGDIPAGTAEDVEIIVAAARDA
 SlAMADH1 1 MANRNVPI PRRLQYIIGGIEWREPVKKNRIPIINPATEEIIIGDIPAAATAEDVDIIVAVEAARKA
 SlAMADH2 1 MAIPNIRIPCRQLFIDGIEWREPILKKNRPIINPANEIIGYIPAATEEDVDMAVKAARSA
 SoBADH1 1 MAF---PIPARQLFIDGIEWREPILKKNRIPVNPSTEEIIGDIPAAATAEDVEVAVVAARRA
 OsAMADH1 1 MAAP-SAI PRRLFIGGAWREPSLGRRRLPVNPATEATIGDIPAAATAEDVELAVSAARDA
 OsAMADH2 1 MAT---AIPQRQLFVAGEWRAPALGRRLPVNPATESPIGEIPAGTAEDVDVAVAAREEA
 HvAMADH1 1 MAAP-PAI PRRLFIGGAWREPTLGRRLPVNPATEDTIGDIPAAATAEDVELAVAAARSA
 HvAMADH2 1 MVAP-AKIPQRQLFIDGIEWRAPALGRRLPVNPTEVSIIGEIPAGTSEDVDVAVAARRAA

AtALDH10A8 58 LSRNKGKDWAKAPGAVRAKYLRRAIAAKVNERKTDLAKLEALDCGKPLDEAVWMDDDVAGC
 AtALDH10A9 58 FTRNNGKDWARATGAVRAKYLRRAIAAKVIERKSELANLEALDCGKPLDEAAWMDDDVAGC
 PsAMADH1 58 LSRKNGRDWSAASGSLRARYLRRAIAAKIKEKKDELGKLESIDCGKPLEEALADLDDVVAC
 PsAMADH2 58 LTRNKGADWATASGAVRARYLRRAIAAKVTEKKPELAKLESIDCGKPLDEAAWMDDDVAGC
 ZmAMADH1a 60 LKRNRRGRDWARAPGAVRAKYLRRAIAAKVIERKPELAKLEALDCGKPYDEAAWMDDDVAGC
 ZmAMADH1b 61 LKRNRRGRDWARAPGAVRAKYLRRAIAAKVIERKQELAKLEALDCGKPYDEAAWMDDDVAGC
 ZmAMADH2 60 FSRDGGQRWSRAPGAVRANFLRAIAAKIKDRKSELALLETLDSGKPLDEASGMDDDVAAC
 SlAMADH1 61 IARD---DWGSTTGAQRAKYLRRAIAAKVLEKKSVALLETSLDSGKTLYESAAMDDDVAGC
 SlAMADH2 61 LRRD---DWGSTTGAQRAKYLRRAIAAKVLEKKEPELATLETIDNGKPFWEAASLDDVVAC
 SoBADH1 58 FRRN---NWSATSGAHRATYLRRAIAAKITEKDHFKLETIDSGKPFDEAVLDLDDVASC
 OsAMADH1 60 FGRDGGRHWSRAPGAVRAKYLRRAIAAKIKDKKSYLALLETLDSGKPLDEAAWMDDDVAGC
 OsAMADH2 58 LKRNRRGRDWARAPGAVRAKYLRRAIAAKIIEKSELARLETIDCGKPLDEAAWMDDDVAGC
 HvAMADH1 60 FLLDGGSRWARASGATRAKYLRRAIAAKIIEKISYALLETVDSGKPKDEAVAMDMDVAAC
 HvAMADH2 60 LKRNRRGRDWSRAPGAVRAKYLRRAIAAKMIERKSDLARLEALDCGKPLDEAAWMDDDVAGC

AtALDH10A8 118 FEYYADLAEGLDAKQKAPVSLPMESEFKSYVLKQPLGVVGLITPWNYPLIMAVWVKVAPSLA
 AtALDH10A9 118 FEYYADLAEGLDAKQKTPSLPMDTFKGYILKEPIGVVGMITPWNYPLIMAVWVKVAPSLA
 PsAMADH1 118 FEYYAGLAEELDSKQKAPISLPMDFKSYILKEPIGVVALITPWNYPLIMATWKTAPALA
 PsAMADH2 118 FEYYADLAEKLDARQKAPVSLPMDTFKSHVLRPEPIGVVGLITPWNYPLIMATWKTAPALA
 ZmAMADH1a 120 FEYFADQAEALDKRQNSPVSPLPMESEFKCHLRREPIGVVGLITPWNYPLIMATWKTAPALA
 ZmAMADH1b 121 FEYFADQAEALDKRQNSPVSPLPMESEFKCHLRREPIGVVGLITPWNYPLIMATWKTAPALA
 ZmAMADH2 120 FEYYADLAEALDGKQRSPISLPMENFKSYVLKEPIGVVGLITPWNYPLIMATWKTAPALA
 SlAMADH1 118 FEYYAGLAEALDSRRMTPVNLNSDSYKSYVLREPLGVVGLITPWNYPLIMATWKTAPALA
 SlAMADH2 118 FEYYADLAEALDSKQTEVKLHLDSFKTHVLRPEPLGVVGLITPWNYPLIMATWKTAPALA
 SoBADH1 115 FEYFAGQAEALDGKQKAPVTLPMERFKSHVLRQPLGVVGLISPWNYPLIMATWKTAPALA
 OsAMADH1 120 FEYYADLAEALDGKQRAPISLPMENFESYVLKEPIGVVGLITPWNYPLIMATWKTAPALA
 OsAMADH2 118 FEYFADLAEALDKRQNSPVSPLPMESEFKCYLRREPIGVVGLITPWNYPLIMATWKTAPALA
 HvAMADH1 120 FEYYAALAEALDGKQHAPISLPMEEFKTYVLKEPIGVVGLITPWNYPLIMATWKTAPALA
 HvAMADH2 120 FEFFAGHAEALDKRQNAVALP-ENFKCHLKEPIGVVGLITPWNYPLIMAVWVKVAPALA

AtALDH10A8 178 AGCTAIIKPSSELASVTCLELADICREVGLPPGVLNVLTFGSEAGAPLASHPGVDKIAFT
 AtALDH10A9 178 AGCTAIIKPSSELASLTCLELADICREVGLPPGVLNILTGLGTEAGAPLASHPHVDKIVFT
 PsAMADH1 178 AGCAAILKPSSELASVTCLELGEICKEVGLPRLGVLNIVTGLGHEAGASLASHPDVDKISFT
 PsAMADH2 178 AGCAAILKPSSELASLTCLELGEICKEVGLPRLGVLNILTGLGPEAGAPLATHPDVDKVAFT
 ZmAMADH1a 180 AGCTAVLKPSSELASVTCLELADICKEVGLPRLGVLNIVTGLGPDAGAPLSAHPDVDKVAFT
 ZmAMADH1b 181 AGCAAVLKPSSELASVTCLELADICKEVGLPRLGVLNIVTGLGPDAGAPLSAHPDVDKVAFT
 ZmAMADH2 180 AGCTTIIKPSSELASVSCLELGAICMEIGLPPGVLNIIITGLGPEAGAPLSSHVDKVAFT
 SlAMADH1 178 AGCAAILKPSSELASITCLELGEICREIGLPSGALNILTGLGPEAGGPLASHPHVDKISFT
 SlAMADH2 178 AGCAAILKPSSELASITSLELGEICREVGLPPGALSILTGLGHEAGSPLVSHPDVDKIAFT
 SoBADH1 175 AGCTAVLKPSSELASVTCLFEGEVNEVGLPRLGVLNILTGLGPDAGAPLVSHPDVDKIAFT
 OsAMADH1 180 AGCTAVLKPSSELASLTCLELGGICAEIGLPPGVLNIIITGLGTEAGAPLASHPHVDKIAFT
 OsAMADH2 178 AGCTAVLKPSSELASVTCLELADVCKEVGLPRLGVLNIVTGLGSEAGAPLSSHVDKVAFT
 HvAMADH1 180 AGCTAVLKPSSELASLTCLELGAICEEIGLPSGVLNIIITGLGPDAGAPIASHPHVDKIAFT
 HvAMADH2 179 AGCTAVLKPSSELASVTCLELGDVCKEVGLPRLGVLNIVTGLGNEAGAPLSSHVDVDKVAFT

		Ser239	Thr242	Lys245	Glu260	Phe284	Trp288	Asn290	Ile293	Ser295	Cys294
AtALDH10A8	238	GSFATGSKV	MTAAQLVKPVS	ME	ELGGKSPLIVFDDV	-DLDKAAEWA	IFGCFW	INGQI	CSA		
AtALDH10A9	238	GSTITGSS	IMTSAAKLVKPV	SIE	ELGGKSPIIVFDDV	-DIDKAVEWT	MF	FGCFW	INGQI	CSA	
PsAMADH1	238	GSSATGSK	IMTAAQLVKPVS	IE	ELGGKSPIVVFEDV	-DLDKVAEWT	V	FGCF	F	INGQI	CSA
PsAMADH2	238	GSSATGSK	IMTAAQLVKPVS	IE	ELGGKSPLVVFEDV	-DLDKAAEWA	IFGCFW	INGQI	CSA		
ZmAMADH1a	240	GSFETGKK	IMASAAPMVKPV	TIE	ELGGKSPIVVFDDV	-DIDKAVEWT	IFGCFW	INGQI	CSA		
ZmAMADH1b	241	GSFETGKK	IMAAAA	P	MVKPVTIE	ELGGKSPIVVFDDV	-DIDKAVEWT	IFGCFW	INGQI	CSA	
ZmAMADH2	240	GSTETGKR	IMTSAQMVKPV	SIE	ELGGKSPLIVFDDI	G	DIDKAVEWT	MF	GI	FANAGQV	CSA
SlAMADH1	238	GSGFTGSK	IMTAAQLVKPVS	IE	ELGGKSPIVVFDDI	DNLDIAAEWT	IFGI	FAN	TGQV	CSA	
SlAMADH2	238	GSGFTGVK	IMTAAQLVKPV	TIE	ELGGKSPIVVFDDI	HNLD	TAVEWT	IFGCFW	INGQI	CSA	
SoBADH1	235	GSSATGSK	VMSAAQLVKPV	TIE	ELGGKSPIVVFEDV	-DIDKVVEWT	IFGCFW	INGQI	CSA		
OsAMADH1	240	GSTETGKR	IMITASQMVKPV	SIE	ELGGKSPLIVFDDV	-DIDKAVEW	AM	FGCF	FANAGQV	CSA	
OsAMADH2	238	GSYETGKK	IMASAAPMVKPV	SIE	ELGGKSPIVVFDDV	-DVEKAVEWT	IFGCFW	INGQI	CSA		
HvAMADH1	240	GSTATGKT	IMTAAQMVKPV	SIE	ELGGKSPLIVFDDV	ADIDKAVEW	AM	FGCF	F	INGQV	CSA
HvAMADH2	239	GSYATGQK	IMVAAAPT	V	KPVTIE	ELGGKSPIVVFDDV	-DIDKAVEWT	IFGCFW	INGQI	CSA	

AtALDH10A8	297	TSRLLVHESIASEFIEKLVKWSKNIKISDPMEEGCRLGPVVS	KGQY	EKILKFI	STAKSEG							
AtALDH10A9	297	TSRLLVHERIADEF	FLDKLVKWT	KNIKISDP	FEEGCRLGPVVS	KGQY	ERVLK	FN	S	ARNEG		
PsAMADH1	297	TSRLIVHESI	AVEFVDKLVKWA	ENIKISDP	LEEGCRLGPIVSE	AQY	KV	LN	C	ISSAKSEG		
PsAMADH2	297	TSRLILHESI	ATEFLNRI	V	KNIKISDP	LEEGCRLGPVVS	EGQY	EKILK	FN	SNAKSEG		
ZmAMADH1a	299	TSRLLIHTKIAK	KNERMVAWAKNIKVS	DP	LEEGCRLGPVVS	EGQY	EKIK	KF	S	NAKSQG		
ZmAMADH1b	300	TSRLLVHTKIAK	EFNEK	MVAWAKNIKVS	DP	LEEGCRLGPVVS	EGQY	EKIK	KF	LN	AKSEG	
ZmAMADH2	300	TSRLLLHEKIAK	FLDRLVAWAKNIKVS	DP	LEEGCRLG	SVI	SEGQY	EKIK	KF	I	STARSEG	
SlAMADH1	298	TSRLIVQENIAS	AFMDRL	LKWT	KNIKISDP	LEEDCKL	GPVVS	AGQY	E	VLK	FN	AKSEG
SlAMADH2	298	TSRLIIQETI	APQFLARLLEW	T	KNIKISDP	LEEDCKL	GPVI	S	R	QY	EKILK	FISTAKDEG
SoBADH1	294	TSRLLVHESI	AAEFVDKLVKWT	KNIKISDP	FEEGCRLGPVI	S	KGQY	D	K	M	KF	FISTAKSEG
OsAMADH1	299	TSRLLLHEKIAK	RFLDRLVAWAKSIKISDP	LEEGCRLG	SVV	SEGQY	Q	K	M	KF	I	STARCEG
OsAMADH2	297	TSRLILHKKIAK	EFQERMVAWAKNIKVS	DP	LEEGCRLGPVVS	EGQY	EKIK	Q	V	S	TAKSQG	
HvAMADH1	300	TSRLLLHEKIAER	FLDRLVEWAKNIKISDP	LEEGCRLG	SVI	SKGQY	EKIK	KF	I	S	TARSEG	
HvAMADH2	298	TSRLLIHKNIAK	EFVDRMVAWSKNIKVS	DP	LEEGCRLGPVVS	EGQY	EKIK	KF	V	ANAKTEG		

AtALDH10A8	357	ATILHGGSRPEHLEKGF	FIEPTIITDVT	TSMQI	WREEVFGPVL	CVKTF	FASE	DEA	I	E	I	E	L	A	N	D					
AtALDH10A9	357	ATVLCGGVRPEHLKKG	FVFEPAIVSNVT	TSM	E	I	WREEVFGP	AL	CVKTF	STED	E	A	I	Q	L	A	N	D			
PsAMADH1	357	ATILTGGRRPEHLKKG	FVFEPTIITDVT	TSMQI	WREEVFGPVL	AVKTF	STEE	E	A	I	N	L	A	N	D						
PsAMADH2	357	ATILTGGSRPEHLKKG	FVFEPTIITDVT	TNMQI	WREEVFGPVL	CVKTF	STEE	E	A	I	D	L	A	N	D						
ZmAMADH1a	359	ATILTGGVRPAHLEKGF	FIEPTIITDIT	TSM	E	I	WREEVFGPVL	CVKE	F	STED	E	A	I	E	L	A	N	D			
ZmAMADH1b	360	ATILTGGVRPAHLEKGF	FIEPTIITDIT	TSM	E	I	WREEVFGPVL	CVKE	F	STED	E	A	I	E	L	A	N	D			
ZmAMADH2	360	ATILYGGGRPQHLRRG	FFLEPTIITDV	TSMQI	WQEEVFGPVI	CVKE	FRTD	SE	A	V	E	L	A	N	D						
SlAMADH1	358	ATILCGGERPQHLKKG	YVQPTIITDV	NTSM	E	I	WKEEVFGPVL	CVKTF	KT	E	E	A	I	E	L	A	N	D			
SlAMADH2	358	ATILYGGDRPEHLKKG	YIQPTIITDV	TSM	E	I	WKEEVFGPVL	CVKTF	KT	E	E	A	I	E	L	A	N	D			
SoBADH1	354	ATILYGGSRPEHLKKG	YIEPTIVTD	ISTSMQI	WKEEVFGPVL	CVKTF	SS	E	D	E	A	I	A	L	A	N	D				
OsAMADH1	359	ATILYGGARPQHLKR	GFIEPTIITNV	STSMQI	WREEVFGPVI	CVKE	F	R	T	E	R	E	A	V	E	L	A	N	D		
OsAMADH2	357	ATILTGGVRPKHLEKGF	YIEPTIITD	V	TSMQI	WREEVFGPVL	CVKE	F	S	T	E	E	A	I	E	L	A	N	D		
HvAMADH1	360	ATILHGGDRPKNLG	KGFIEPTIITG	V	STSMQI	WREEVFGPVI	CVKVF	K	T	E	S	E	A	V	E	L	A	N	D		
HvAMADH2	358	ATILTGGVRPKHLEKGF	FIEPTIITD	I	NTSM	E	I	WREEVFGPVL	CVKE	F	S	T	E	E	A	I	E	L	A	N	D

		Ile444	Gln451	Pro452	Cys453	Trp459	
AtALDH10A8	417	SHYGLGAAVISNDTERCDRI	SEAFEAGIVW	INCS	QPCFTQAFWGGV	KRSGFGRELGEWGL	
AtALDH10A9	417	SQYGLAGAVLSNDLERC	DRVSKAFQAGIVW	INCS	QPCFCQAFWGGTKRSGFGRELGEWGL		
PsAMADH1	417	THYGLGSAVMSNDLERCERL	SKALQAGIVW	INCA	QPSFIQAFWGGIKRSGFGRELGEWGL		
PsAMADH2	417	TVYGLGAAVISNDLERCER	VTKAFKAGIVW	VNCS	QPCFTQAFWGGV	KRSGFGRELGEWGL	
ZmAMADH1a	419	TQYGLAGAVISGDRERC	QRLSEEDAGCI	WVNC	SQPCFCQAFWGGNKRSGFGRELGEWGL		
ZmAMADH1b	420	TQYGLAGAVISGDRERC	QRLSEEDAGI	I	WVNC	SQPCFCQAFWGGNKRSGFGRELGEWGL	
ZmAMADH2	420	THYGLAGAVISNDQERCER	ISKALHSGII	W	INCS	QPCFVQAFWGGNKRSGFGRELGEWGL	
SlAMADH1	418	TKYGLGAAVMSKDVKRCER	FTKAFQGTGI	I	W	INCS	QPTENELEFWGGKRSFGFRDLGKWL
SlAMADH2	418	TKFGLGAAILSKDLERCER	FTKAFQSGIVW	INCS	QPCFWQPEWGGKRSFGRELGEWSL		
SoBADH1	414	TEYGLAAAVFSNDLERCER	ITKALEVGAVW	VNCS	QPCFVQAFWGGIKRSGFGRELGEWGI		
OsAMADH1	419	THYGLAGAVISNDLERCER	ISKALQSGIVW	INCS	QPCFVQAFWGGNKRSGFGRELQWGL		
OsAMADH2	417	THYGLAGAVLSGDRERC	QRLTEEDAGI	I	WVNC	SQPCFCQAFWGGNKRSGFGRELGEWGL	
HvAMADH1	420	THYGLAGGAVISDDLERCER	IAKVIHSGIVW	INCS	QPTLVQAFWGGNKRSGFGRELGEWGL		
HvAMADH2	418	THYGLAGAVISGDRERC	QRLAEIEAGCI	WVNC	SQPCFCQAFWGGNKRSGFGRELGEWGL		

				Partie N-terminale
AtALDH10A8	477	DNYLSVKQVTLYTS-NDPWGWYKSPN--		
AtALDH10A9	477	ENYLSVKQVTQYIS-DEPWGWYKPPSKI		
PsAMADH1	477	ENYLSVKQVTRYTS-DEPWGWYQPPSKI		
PsAMADH2	477	DNYLSVKQVTQYIS-EEPWGWYQPPAKI		
ZmAMADH1a	479	DNYLSVKQVTEYIS-DEPWGWYQSPSKI		
ZmAMADH1b	480	DNYLSVKQVTEYIS-DEPWGWYRSPSKI		
ZmAMADH2	480	DNYLTVKQVTKYCS-DEPWGWYQPPSKI		
SlAMADH1	478	ENFLNIKQVTEYTS-AEPLAFYKSPSKN		
SlAMADH2	478	ENYLNLIKQVTQYVTPDEPWAFYKSPSKI		
SoBADH1	474	QNYLNLIKQVTQDIS-DEPWGWYKSP---		
OsAMADH1	479	DNYLSVKQVTKYCS-DEPYGWYRPPSKI		
OsAMADH2	477	DNYLSVKQVTEYAS-DEPWGWYKSPSKI		
HvAMADH1	480	ENYLSVKQVTRYCK-DELYGWYQRPSKI		
HvAMADH2	478	DNYLSIKQVTEYTS-DAPWGWYKAPAN-		

Figure 16 : Alignement des séquences protéiques de AtALDH10A8 et AtALDH10A9 avec d'autres ALDH10 végétales. Les résidus importants pour le fonctionnement de l'enzyme et la spécificité de substrat sont identifiés avec le numéro correspondant à PsAMADH1. Les numéros en début de ligne correspondent à la position du premier résidu de la ligne. Abréviations : At : *Arabidopsis thaliana*. Ps : *Pisum sativum*. Zm : *Zea mays*. Sl : *Solanum lycopersicum*. Os : *Oryza sativa*. Hv : *Hordeum vulgare*.

a. Site de fixation du coenzyme

Les ALDH10 sont des oxydoréductases (EC 1.2.1.8) (Sophos and Vasiliou 2003). Leur activité consiste en l'oxydation d'un substrat accompagnée de la réduction du NAD^+ ou du NADP^+ . Les résidus interagissant avec le NAD^+ sont deux thréonines en positions 159 et 242 (Thr159 et Thr242), deux lysines en positions 185 et 245 (Lys185 et Lys245), une sérine en position 239 (Ser239) et un glutamate en position 188 (Glu188) (Figure 16) (Tylichová *et al.* 2010). L'activité des ALDH10 avec le NAD^+ comme coenzyme est près de 20 fois supérieure à celle avec le NADP^+ (Arakawa *et al.* 1990; Kopečný *et al.* 2013). Glu188 est responsable de cette spécificité pour le NAD^+ car il gêne la liaison du groupe phosphate du NADP^+ (Tylichová *et al.* 2010; Kopečný *et al.* 2013; Muñoz-Clares *et al.* 2014). Tous les résidus de site de fixation du coenzyme sont identifiés chez les deux AtALDH10 (Tableau 11). Seule la Lys245 n'est pas strictement conservée. Elle est remplacée par une sérine chez AtALDH10A9 (Figure 16). Glu188 est présent chez AtALDH10A8 et AtALDH10A9. **Le NAD^+ est donc très probablement le cofacteur préférentiel des deux ALDH10 d'*Arabidopsis*, comme pour l'ensemble des ALDH10.**

Tableau 11 : Fonctions attribuées à quelques-uns des résidus de AtALDH10A8 et AtALDH10A9 dans la fixation du coenzyme, du cation et du substrat, suggérées par homologie avec les ALDH10 d'autres espèces. Les spécificités de substrat possibles des AtALDH10 déduites de ces résidus sont indiquées.

Résidu	Rôle dans la fonction enzymatique
Thr242 Lys185 Thr159 Ser239 Lys/Ser245 Glu188	Site de fixation du coenzyme Spécificité pour le NAD ⁺
Val30 Asp99 Leu189	Site de fixation du cation
Trp109 Pro452 Asn162 Tyr163 Leu166 Met167 Trp170 Phe284 Ile293 Ser295 Gln451 Trp459 Asp110 Asp113 Asn162	Site de fixation du substrat
Glu260 Cys294 Cys453	Site catalytique Spécificité de substrat moins large que SIAMADH1
Ile444	Faible spécificité pour la BAL
Trp288	Forte activité sur l'ABAL et l'APAL
SKL	Signal d'adressage peroxysomal (AtALDH10A9)

b. Site de fixation du cation

Chez les ALDH10, un cation Na⁺ permet le maintien de l'intégrité structurale de la protéine et/ou la stabilisation de la boucle impliquée dans la fixation du NAD⁺ (Perez-Miller and Hurley 2003). Il est présent dans une cavité située à proximité du site de fixation du coenzyme (Tylichová *et al.* 2010; Kopečný *et al.* 2013). Le site de fixation du cation est formé par trois résidus aux positions 30, 99 et 189 (Tylichová *et al.* 2010; Kopečný *et al.* 2013). Le résidu en

position 30 peut être une isoleucine (Ile30) ou une valine (Val30). Ile30 est présente chez les deux ALDH10 du pois et celles de la tomate. Val30 est partagée par les ALDH10 du maïs et du riz. Le résidu en position 99 est un acide aspartique (Asp99) partagé par l'ensemble des ALDH10. En position 189, toutes les ALDH10 portent une leucine (Leu189). Les séquences de AtALDH10A8 et AtALDH10A9 comportent chacune ces trois résidus, Val30, Asp99 et Leu189 (Figure 16, Tableau 11). **Il est donc probable que le cation des ALDH10 d'Arabidopsis soit Na⁺.**

c. Peptide signal d'adressage peroxysomal

Certaines ALDH10 portent le tripeptide signal d'adressage peroxysomal SKL en position C-terminale. La localisation peroxysomale de certaines ALDH10 a été démontrée par fusion à la green fluorescent protein (GFP). C'est notamment le cas d'OsAMADH1 (Mitsuya *et al.* 2009). **L'alignement confirme la présence de ce peptide chez AtALDH10A9** (Figure 16, Tableau 11). La localisation peroxysomale de cette dernière a également été montrée par fusion à la GFP dans les cellules d'oignon (Missihoun *et al.* 2011; Zarei *et al.* 2016). Il est en revanche absent chez ALDH10A8 (Figure 16). Des études de fusion de la protéine à la GFP ont suggéré que cette dernière serait localisée dans les leucoplastes (Missihoun *et al.* 2011) ou les plastes (Zarei *et al.* 2016).

d. Résidus conservés du site catalytique

Chez les ALDH10, un canal permet la fixation du substrat. Chez les PsAMADH, il est formé des résidus Ala/Trp109, Pro452, Asn162, Tyr163, Leu166, Met167, Trp170, Phe284, Ile293, Ser295, Gln451 et Trp459 (Tylichová *et al.* 2010) (Figure 16). Deux résidus acides aspartiques très conservés, Asp110 et Asp113, interagissent également avec le substrat. Ils sont responsables de la haute affinité de l'ensemble des ALDH10 pour les aminoaldéhydes (Kopečný *et al.* 2013). Le site catalytique est situé au fond de ce canal. Il est formé de trois acides aminés strictement conservés : Asn162, Glu260, et Cys294 (Tylichová *et al.* 2010; Kopečný *et al.* 2013). Cys294 est la cystéine catalytique. Elle est directement impliquée dans l'échange d'électrons entre le NAD⁺ et le substrat (Wymore *et al.* 2004). L'ensemble des résidus formant le canal du substrat, ainsi que les trois acides aminés du site catalytique, sont présents chez AtALDH10A8 et AtALDH10A9 (Figure 16, Tableau 11). **Ainsi, les principaux résidus responsables de la prise en charge des aminoaldéhydes ont été identifiés chez les AtALDH10.**

e. Résidus responsables de la spécificité de substrat

Le résidu situé en position 453 est important pour la spécificité de substrat des ALDH10 (Tylichová *et al.* 2010; Kopečný *et al.* 2013). PsAMADH2, SIAMADH2, les trois ZmAMADH, les deux OsAMADH et HvAMADH2 portent une cystéine (Cys453). PsAMADH1 porte une sérine (Ser453). SIAMADH1 porte une thréonine (Thr453) (Figure 16). Thr453 élargit le canal du substrat, ce qui permet la fixation de substrats plus volumineux, comme des aldéhydes aromatiques. Il en résulte une affinité pour une plus grande gamme d'aldéhydes (Kopečný *et al.* 2013). En revanche, Cys453 ou Ser453 rendent le canal plus étroit. AtALDH10A8 et AtALDH10A9 portent toutes les deux une Cys453 (Figure 16, Tableau 11). Cela suggère que **les AtALDH10 ne sont pas capables de prendre en charge une gamme de substrats aussi diversifiée que SIAMADH1.**

Le résidu situé en position 288 est crucial pour la spécificité de substrat des ALDH10 (Tylichová *et al.* 2010; Kopečný *et al.* 2013). Chez PsAMADH2, SIAMADH2, ZmAMADH1a et ZmAMADH1b, il s'agit d'un tryptophane (Trp288). SIAMADH1 et ZmAMADH2 portent une alanine (Ala288). PsAMADH1 porte une phénylalanine (Phe288) (Figure 16). Le Trp288 réduit le volume du canal du substrat (Tylichová *et al.* 2010). Il en résulte une meilleure affinité pour les aminoaldéhydes linéaires, comme le 3-aminopropionaldéhyde (APAL) et le 4-aminobutyraldéhyde (ABAL). A l'inverse, Ala288 et Phe288 génèrent une spécificité plus élevée pour le TMABAL que pour l'APAL et l'ABAL (Tylichová *et al.* 2010). AtALDH10A8 et AtALDH10A9 portent toutes les deux un Trp288 (Figure 16, Tableau 11), ce qui suggère **qu'elles seraient plus actives sur l'APAL et l'ABAL que sur le TMABAL.**

Le résidu en position 444 est important pour l'affinité des ALDH10 pour la bêtaïne aldéhyde (BAL) (Kopečný *et al.* 2013). ZmAMADH1a et HvAMADH2 portent une cystéine (Cys444). SoBADH1 porte une alanine (Ala444). Toutes les autres portent une isoleucine (Ile444). Cette dernière a pour effet de rendre plus étroit le canal de fixation du substrat (Kopečný *et al.* 2013). Il en résulte une plus faible affinité pour la BAL. A l'inverse, la Cys444 et l'Ala444 sont présentes chez des ALDH10 ayant une haute affinité pour la BAL (Kopečný *et al.* 2013). Les deux AtALDH10 portent une Ile444 (Figure 16, Tableau 11). Cela suggère que **les AtALDH10 seraient peu actives avec la BAL.**

Ainsi, l'analyse des séquences de AtALDH10A8 et AtALDH10A9 suggèrent qu'elles pourraient prendre en charge l'ABAL et l'APAL plus efficacement que le *N-N-N*-triméthyl-4-aminobutyraldéhyde (TMABAL). En revanche, elles seraient faiblement actives avec la BAL.

Cette analyse de séquence n'a pas permis d'identifier une spécificité d'action de l'une ou l'autre des deux AtALDH10. Cela suggère que les deux paralogues sont certainement proches en termes de propriétés. Seul, le peptide signal SKL de localisation peroxysomale, porté uniquement par AtALDH10A9, semble les différencier.

2. Caractérisation *in vitro* de l'activité enzymatique des AtALDH10

Les ADNc de *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* ont précédemment été isolés par notre équipe (Zhao 2014). Ils ont été clonés ici dans le plasmide d'expression pCDF-Duet et des bactéries BL21 ont été transformées avec les constructions correspondantes. Dans le cadre d'une collaboration avec le département de protéomique et de biochimie des protéines du centre de recherche de la région de Haná (République Tchèque, Dr. D. Kopečný et Dr. M. Kopečná), les protéines AtALDH10A8 et AtALDH10A9 recombinantes ont été purifiées. L'activité de ces deux enzymes sur huit des principaux aminoaldéhydes pouvant être pris en charge par les AtALDH10 végétales : l'APAL, l'ABAL, le TMABAL, le 4-guanidinobutyraldéhyde (GBAL), le 3-guanidinopropionaldéhyde (GPAL), le triméthyl-3-aminopropionaldéhyde (TMAPAL), la BAL, et le diméthyl-4-aminobutyraldéhyde (DMABAL), a été caractérisée *in vitro* et comparée. Pour cette expérience, une concentration en substrat de 1 mM a été utilisée. Elle a pour but d'étudier la diversité de substrats pouvant être pris en charge par les AtALDH10.

a. Diversité des substrats

AtALDH10A8 et AtALDH10A9 sont capables d'oxyder tous les substrats testés : l'APAL, l'ABAL, le TMABAL, le GBAL, le DMABAL, la BAL et le TMAPAL (Figure 17 A). **L'APAL Le meilleur substrat des deux isoenzymes.** AtALDH10A9 est significativement plus active que AtALDH10A8 sur l'APAL, avec une activité enzymatique de 73 nkat mg⁻¹ contre 30 nkat mg⁻¹. Les activités des deux AtALDH10 sur l'ABAL sont de 10 nkat mg⁻¹ et 15 nkat mg⁻¹, respectivement. **Le TMABAL est oxydé par AtALDH10A8 et AtALDH10A9 de manière comparable**, à un niveau de 19 nkat mg⁻¹, correspondant à une activité relative de 51 % et de 20 % de celle de l'APAL, respectivement (Figure 17 B). **Le TMABAL est donc l'un des meilleurs substrats de AtALDH10A8.** L'activité de AtALDH10A8 et AtALDH10A9 avec le DMABAL est de 29 et 26 nkat mg⁻¹, soit une activité relative de 80 % et 28 %, respectivement. Le DMABAL est donc lui aussi parmi les meilleurs substrats de AtALDH10A8. L'activité de AtALDH10A8 et AtALDH10A9 avec le GBAL est de 7 nkat mg⁻¹ et 26 nkat mg⁻¹, respectivement. Avec le TMAPAL elle est de 9 nkat mg⁻¹ et 22 nkat

mg⁻¹, respectivement. Avec le GPAL, elle est de 6,5 nkat mg⁻¹ et 5 nkat mg⁻¹, respectivement. **La BAL est le substrat le moins efficacement pris en charge par AtALDH10A8 et AtALDH10A9** avec respectivement 4 nkat mg⁻¹ et 1 nkat mg⁻¹ (Figure 17 A).

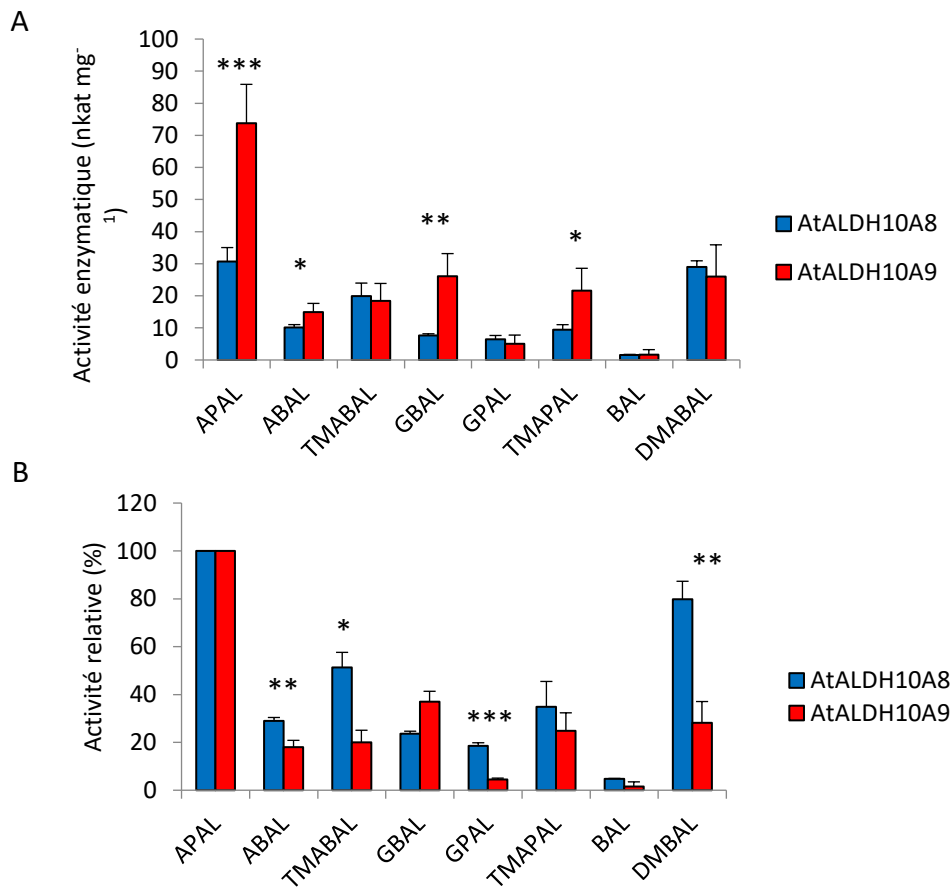


Figure 17 : Activité totale (A) et activité relative au substrat préférentiel (l'APAL) (B) des enzymes recombinantes AtALDH10A8 et AtALDH10A9, produites dans *E. coli*, sur différents substrats possibles des ALDH10. Les mesures d'activité sont réalisées sur une concentration en substrat de 1 mM. Les astérisques indiquent la significativité de la différence d'activité entre les deux isoenzymes selon le test de Student. * : p-value<0.05 ; ** : p-value<0.01 ; *** : p-value<0.001 ; **** : p-value<0.0001.

b. Courbes de saturation

L'activité enzymatique de AtALDH10A8 et de AtALDH10A9 en fonction de la concentration en substrat a été étudiée sur 4 substrats. Cette expérience a pour but de déterminer les courbes de saturation des AtALDH10 en fonction de la concentration des différents substrats. L'APAL, le substrat le plus efficacement pris en charge par les AtALDH10, a été étudié. L'activité avec l'ABAL et le TMABAL, précurseurs respectifs de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) et de la γ -butyrobétaine, a également été caractérisée. L'activité sur le GBAL, un substrat efficacement pris en charge par certaines ALDH10, notamment SIAMADH1, a également été caractérisée.

Enfin, l'activité des deux AtALDH10 avec une concentration d'APAL ou de TMABAL fixe (1 mM ou 300 μ M) et une concentration de NAD⁺ variant de 0 à 1 mM a également été mesurée. Elle a pour but de déterminer s'il peut exister une inhibition de l'activité enzymatique par le coenzyme.

Avec l'APAL, l'activité maximale de AtALDH10A8 est de 150 nkat mg⁻¹ (Figure 18 A). Elle est supérieure à celle de AtALDH10A9, qui est de 105 nkat mg⁻¹ (Figure 18 B). Cependant, l'allure de la courbe montre que **l'activité de AtALDH10A8 est inhibée par les concentrations d'APAL supérieures à 10 μ M** (Figure 18 A), alors que l'activité de AtALDH10A9 ne l'est pas (Figure 18 B). Par conséquent, pour les concentrations supérieures à 200 μ M, l'activité de AtALDH10A9 est supérieure à celle de AtALDH10A8.

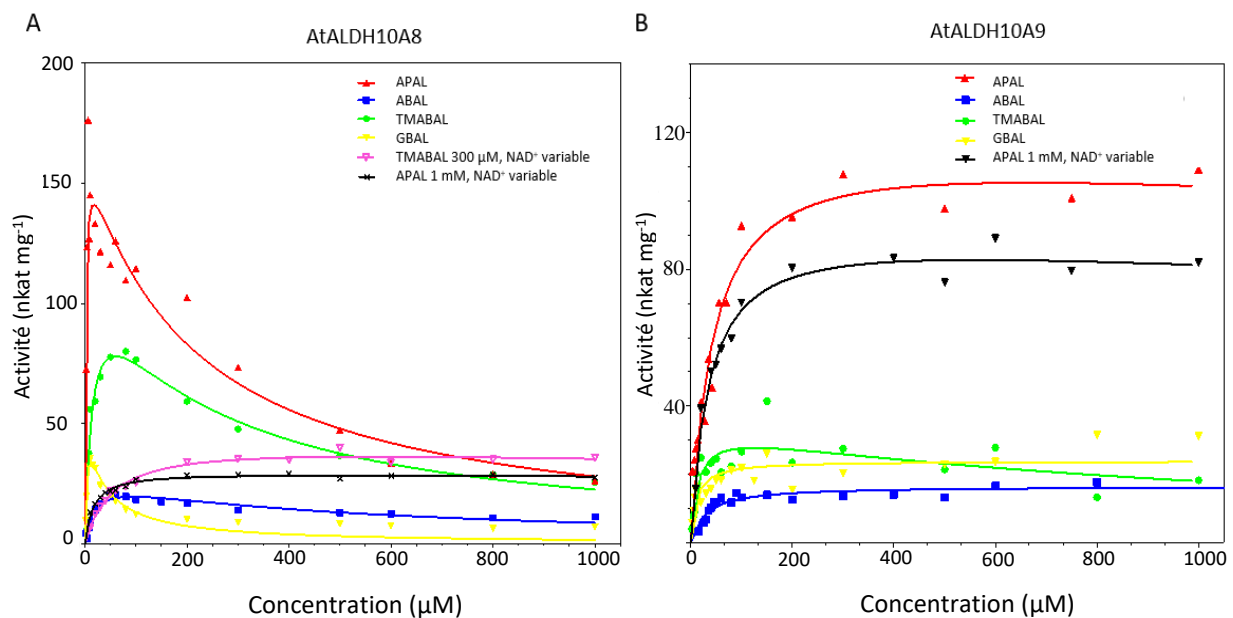


Figure 18 : Courbes de saturation de l'activité de AtALDH10A8 (A) et AtALDH10A9 (B) en présence de l'APAL (en rouge), l'ABAL (en bleu), le TMABAL (en vert) et le GBAL (en jaune), et en fonction de la concentration en NAD⁺ avec 300 μ M de TMABAL (en rose) ou 1 mM APAL (noir).

Avec l'ABAL, les activités maximales des deux isoenzymes sont comparables : environ 15 nkat mg⁻¹ (Figure 18 A). AtALDH10A8 atteint cependant cette activité maximale avec une concentration de substrat de 50 μ M. Son activité est inhibée par les concentrations supérieures à 50 μ M, contrairement à AtALDH10A9 (Figure 18 B).

Avec le TMABAL, l'activité maximale de AtALDH10A8 est de 80 nkat mg⁻¹ (Figure 18 A). Elle est supérieure à celle de AtALDH10A9, qui est de 30 nkat mg⁻¹ (Figure 18 B). **L'activité de AtALDH10A8 et celle de AtALDH10A9 sont inhibées par les concentrations de**

TMABAL supérieures à 50 μM . Avec les concentrations les plus élevées de TMABAL (1 mM) l'activité des deux isoenzymes tend vers une valeur comparable de 25 nkat mg^{-1} .

Avec le GBAL, AtALDH10A8 atteint une activité maximale de 40 nkat mg^{-1} (Figure 18 A). L'activité maximale de AtALDH10A9 est inférieure avec une valeur de 25 nkat mg^{-1} (Figure 18 B). **Cependant, l'activité de AtALDH10A8 est inhibée par les concentrations de GBAL supérieures à 10 μM** alors que l'activité de AtALDH10A9 ne l'est pas. Ainsi, pour une concentration supérieure à 50 μM , AtALDH10A9 a une activité supérieure à celle de AtALDH10A8. Pour AtALDH10A8 et AtALDH10A9, **aucune inhibition par la NAD^+ n'est mesurée** (Figure 18 A et B).

c. Détermination des paramètres enzymatiques

Pour chacune des deux AtALDH10, les valeurs des paramètres enzymatiques K_m , V_{\max} , K_{cat} et K_i ont été déterminées pour le TMABAL, le GBAL, l'APAL et l'ABAL (Tableau 12).

Tableau 12 : Paramètres cinétiques de AtALDH10A8 et AtALDH10A9 sur différents substrats. Les valeurs de K_m , de K_i et de K_d sont données en μM , les valeurs de V_{\max} sont données en nkat mg^{-1} , les valeurs de k_{cat} sont données en s^{-1} . Les ratios k_{cat}/K_m , en $\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$, sont présentés.

AtALDH10A8						
	K_m (μM)	V_{\max} (nkat mg^{-1})	k_{cat} (s^{-1})	K_i (μM)	K_d (μM)	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)
TMABAL	15 \pm 3	116,9	6.6 \pm 0.6	241 \pm 48	n.d.	4.4 x 10 ⁵
ABAL	19 \pm 5	27,5	1.5 \pm 0.2	484 \pm 112	n.d.	8.1 x 10 ⁴
GBAL	4 \pm 2	59,9	3.3 \pm 0.6	91 \pm 10	n.d.	7.8 x 10 ⁵
APAL	2 \pm 0.3	164,2	9.7 \pm 0.3	170 \pm 16	n.d.	5.0 x 10 ⁶
NAD^+	16 \pm 1		8.3 \pm 0.1*	-	16 \pm 1	5.2 x 10 ⁵
AtALDH10A9						
TMABAL	17 \pm 2	26,7	2.0 \pm 0.1	986 \pm 123	n.d.	1.2 x 10 ⁵
ABAL	31 \pm 4	16,6	0.9 \pm 0.1	-	n.d.	3.0 x 10 ⁴
GBAL	7 \pm 0.5	23,9	1.3 \pm 0.1	-	n.d.	2.0 x 10 ⁵
APAL	34 \pm 2	111,9	6.3 \pm 0.1	-	n.d.	1.8 x 10 ⁵
NAD^+	33 \pm 4	-	6.3 \pm 0.2	-	28 \pm 2	1.9 x 10 ⁵

Avec l'APAL, les K_m de AtALDH10A8 et AtALDH10A9 sont de 2 μM et 34 μM , respectivement (Tableau 12). La V_{\max} de AtALDH10A8 est de 164,2 nkat mg^{-1} contre

111,9 nkat mg⁻¹ pour AtALDH10A9. **L'activité et la vitesse de réaction maximale de AtALDH10A8 avec l'APAL sont donc plus élevées que celles de AtALDH10A9.**

Avec l'ABAL, les K_m de AtALDH10A8 et AtALDH10A9 sont de 19 μM et 31 μM, respectivement (Tableau 12). AtALDH10A8 atteint aussi une V_{max} plus élevée : 27,5 nkat mg⁻¹ contre 16,6 nkat mg⁻¹. **L'activité et la vitesse de réaction maximale de AtALDH10A8 avec l'ABAL sont donc plus élevées que celle de AtALDH10A9.**

Avec le TMABAL, le K_m de AtALDH10A8 est de 15 μM et celui de AtALDH10A9 est de 17 μM. La V_{max} de AtALDH10A8, de 116,9 nkat mg⁻¹ sur le TMABAL, est plus élevée que celle de AtALDH10A9 qui est de 26,7 nkat mg⁻¹. **Ainsi, l'activité de AtALDH10A8 et AtALDH10A9 avec le TMABAL sont comparables, mais la vitesse de réaction maximale est plus élevée avec ALDH10A8.**

Avec le GBAL, les K_m AtALDH10A8 et AtALDH10A9 sont de 4 μM et 7 μM, respectivement. La V_{max} de AtALDH10A8 est elle aussi supérieure, avec 59,9 nkat mg⁻¹ contre 23,9 nkat mg⁻¹ pour AtALDH10A9. **L'activité et la vitesse de réaction maximale de AtALDH10A8 avec le GBAL sont donc plus élevées que celle de AtALDH10A9.**

Le ratio K_{cat}/K_m de AtALDH10A8 est le plus élevé avec l'APAL (5.0 x 10⁶ s⁻¹M⁻¹). Selon ce critère, **l'APAL est donc le substrat de prédilection de AtALDH10A8.** En revanche, celui de AtALDH10A9 est le plus élevé avec le GBAL (2.0 x 10⁵ s⁻¹M⁻¹). Selon ce critère, **le GBAL est donc le substrat de prédilection de AtALDH10A9.**

d. Recherche du pH optimal

Le pH permettant la réaction optimale a été recherché pour AtALDH10A8 et AtALDH10A9 en présence de trois substrats : l'ABAL, l'APAL et le TMABAL. Le pKa de la cystéine catalytique (Cys294) est de 8,4. Les ALDH10 nécessitent donc un pH supérieur à cette valeur pour que Cys294 soit sous sa forme anionique (Kopečný *et al.* 2013). L'activité a été mesurée pour chaque enzyme et chaque substrat sur une gamme de pH de 8,5 à 10,7 (Figure 19). D'après les mesures réalisées, le pH optimal avec l'APAL comme substrat est de 10,4 pour AtALDH10A8 et de 9,7 pour AtALDH10A9. Avec l'ABAL, le pH optimal est de 10,0 pour AtALDH10A8 et de 9,2 pour AtALDH10A9. Avec le TMABAL, le pH optimal est de 10,7 pour AtALDH10A8 et de 10,0 pour AtALDH10A9. Ainsi, le pH optimal varie selon l'enzyme et le substrat. Mais, pour chacun des trois substrats analysés, **le pH optimal de AtALDH10A8 est supérieur à celui de AtALDH10A9** de 0,7 ou 0,8 point de pH. De plus, Pour une activité

maximale de l'enzyme, le TMABAL requiert un pH plus élevé que l'APAL, qui lui-même requiert un pH plus élevé que l'ABAL.

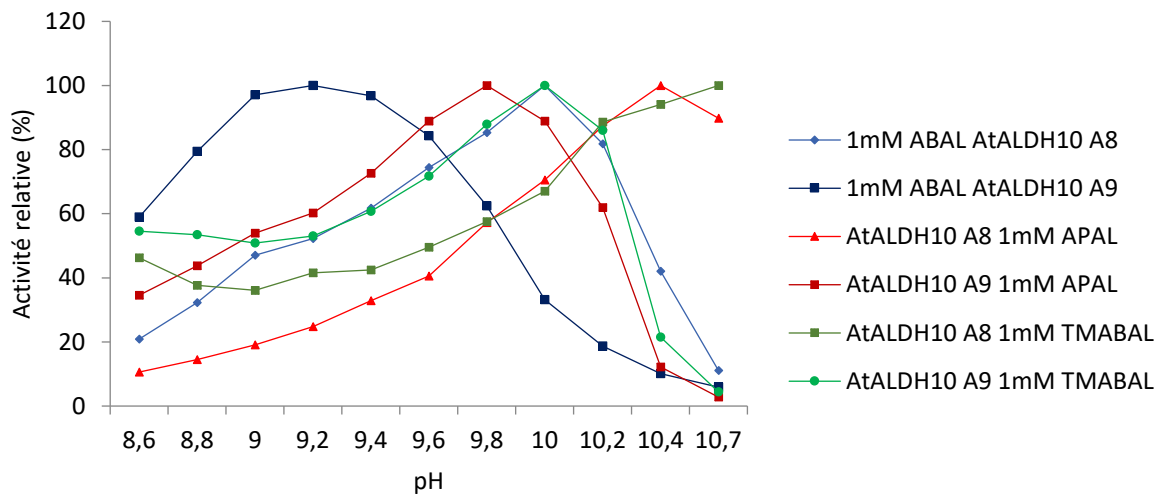


Figure 19 : Activité de AtALDH10A8 et AtALDH10A9 en fonction du pH avec l'ABAL, APAL et TMABAL comme substrats. Pour chaque pH, l'activité est exprimée en pourcentage de l'activité maximale.

3. Etude de l'expression des gènes *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* selon les organes

En complément des analyses d'activité enzymatique, l'expression des gènes *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* a été étudiée chez les plantules âgées de 7 jours, les feuilles de rosette prélevées sur des plantes de 2 semaines, les feuilles caulinaires et les fleurs prélevées sur des plantes âgées de 4 semaines. Cette étude a pour but de déterminer s'il existe des spécificités d'expression pour ces deux gènes entre les organes, et d'étudier une éventuelle corrélation avec leurs spécificités de substrat. Une analyse par RT-PCR quantitative a été réalisée en utilisant le couples d'amorces 10A8_for et 10A8_rev pour *AtALDH10A8*, et 10A9_fwd et 10A9_rev pour *AtALDH10A9*. L'analyse montre que les feuilles caulinaires sont les organes dans lesquels l'expression des deux *AtALDH10* est la plus élevée, et que leur niveau d'expression y est comparable (Figure 20). En revanche, dans les plantules et les fleurs, le niveau d'expression de *AtALDH10A9* est 50 % supérieur à celui de *AtALDH10A8*. Dans les feuilles de rosette, le niveau d'expression de *AtALDH10A9* est environ le double de celui de *AtALDH10A8*. **Ainsi, bien que des différences de niveau d'expression existent, les deux *AtALDH10* sont exprimées dans tous les tissus étudiés.**

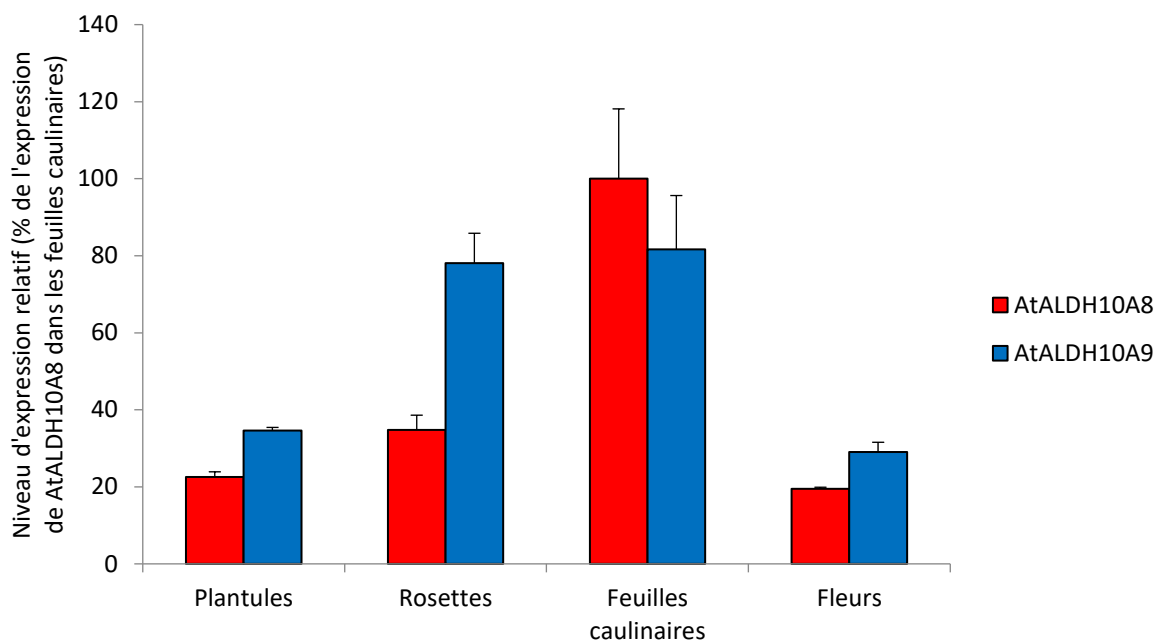


Figure 20 : Analyse par RT-PCR quantitative de l'expression des gènes *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* dans les plantules de 7 jours, les rosettes prélevées sur des plantes de 2 semaines, les feuilles caulinaires et fleurs prélevées sur des plantes âgées de 4 semaines chez Col-0. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Le gène *EF1 α* est utilisé comme gène de référence. Les résultats sont exprimés en % de l'expression de *AtALDH10A8* dans les feuilles caulinaires.

4. Discussion et perspectives

A l'instar des ALDH10 des autres espèces végétales, les mesures de l'activité *in vitro* des enzymes *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* montrent qu'elles sont capables d'oxyder l'APAL, l'ABAL, le TMAPAL, le TMABAL, le GBAL, la BAL et le DMABAL. De plus, les deux *AtALDH10* sont exprimées dans les plantules, les feuilles de rosette et caulinaires et dans les fleurs. Il semblerait donc qu'elles soient ubiquitaires. L'ensemble de ces données suggère une implication possible de *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* dans plusieurs processus physiologiques. Dans le cadre de cette discussion, les paramètres enzymatiques de *AtALDH10A9* publiés par Missihoun et ses collaborateurs (2011) n'ont pas été pris en considération. Ils sont dans des ordres de grandeur très différents (d'un facteur 15 à 200 pour les K_m) de ceux obtenus par Zarei et ses collaborateurs (2016). En revanche, ceux de ces derniers sont dans des ordres de grandeur comparables à ceux des ALDH10 des autres espèces (Tylichová *et al.* 2010; Kopečný *et al.* 2013). Ils ont donc été retenus ici pour appréhender les rôles possibles de ces enzymes chez *Arabidopsis*.

a. Fonctionnalité des ALDH10

i. Activité sur l'APAL

Des sept aminoaldéhydes testés, l'APAL est le meilleur substrat de chacune des deux AtALDH10. Ce résultat est cohérent avec ceux rapportés dans la littérature. En effet, selon l'étude de Zarei et ses collaborateurs (2016), les deux AtALDH10 prennent en charge l'APAL plus efficacement que l'ABAL et la BAL. La préférence pour l'APAL est courante chez les ALDH10 actives sur les aminoaldéhydes linéaires. Elle a également été rapportée chez les deux PsAMADH (Tylichová *et al.* 2010), les trois ZmAMADH, et SlAMADH2 (Kopečný *et al.* 2013). Cette haute affinité pour l'APAL est probablement due au Trp288 dans la séquence des enzymes. Ce résidu réduit le volume du canal du substrat, ce qui favorise l'interaction avec les aminoaldéhydes linéaires. L'inhibition de l'activité de l'enzyme par à partir d'une certaine concentration d'APAL (50 mM à 200 mM) a également été rapportée pour les trois ALDH10 du maïs, les deux ALDH10 de la tomate (Kopečný *et al.* 2013) et les deux ALDH10 du pommier (Zarei *et al.* 2015).

Les K_m calculés ici de AtALDH10A8 et AtALDH10A9 avec l'APAL (1,4 μM et 38,3 μM , respectivement) diffèrent de ceux précédemment rapportés. Sur l'APAL, Zarei et ses collaborateurs (2016) ont mesuré un K_m de 5,5 μM pour AtALDH10A8, et un K_m de 17,3 μM pour AtALDH10A9. Néanmoins, le K_m de AtALDH10A8 mesuré dans le cadre de cette thèse est inférieur à celui de AtALDH10A9, ce qui est en accord avec l'étude de Zarei et ses collaborateurs. Cela signifie qu'AtALDH10A8 a une affinité pour l'APAL plus élevée que celle de AtALDH10A9. La V_{\max} de AtALDH10A8 (1,4 nkat mg^{-1}) est plus faible que celle de AtALDH10A9 (38,3 nkat mg^{-1}). Cependant, les résultats disponibles dans la littérature suggèrent une V_{\max} sensiblement équivalente entre les deux isoformes : 15,8 nkat mg^{-1} et 17,3 nkat mg^{-1} , respectivement (Zarei *et al.* 2016).

Pour conclure, AtALDH10A8 et AtALDH10A9 pourraient toutes les deux être impliquées dans la synthèse de β -alanine. AtALDH10A8 semble plus active que AtALDH10A9 sur les faibles concentrations d'APAL. Son activité est inhibée par une concentration d'APAL supérieure à 50 μM . A l'inverse, AtALDH10A9 est donc plus active sur les concentrations élevées. Ainsi, il est possible que AtALDH10A8 soit spécialisée dans la prise en charge de l'APAL en faible concentration. AtALDH10A9, quant à elle, est spécialisée dans la prise en charge de l'APAL en concentration élevée.

ii. Activité sur l'ABAL

L'ABAL est efficacement pris en charge par AtALDH10A8 et AtALDH10A9. Leur activité respective est de 18 % et 28 % de celle de l'APAL. Elle est comparable à celle de SIAMADH2 et des trois ZmAMADH (entre 20 % et 40 %). Cette activité avec l'ABAL est, là encore, probablement due au Trp288 qui réduit le volume du canal du substrat, favorisant l'interaction avec les aminoaldéhydes linéaires. Avec l'ABAL, le K_m de AtALDH10A8 (19,1 μM) est comparable à celui indiqué dans la littérature (25 μM) (Zarei *et al.* 2016). En revanche ce n'est pas le cas de celui de AtALDH10A9. Le K_m calculé ici (28,6 μM) est près de 16 fois inférieur à celui calculé par Zarei et ses collaborateurs (2016) (460 μM). Toutefois, ces différences peuvent s'expliquer par des conditions expérimentales différentes, notamment un tampon différent. Zarei et ses collaborateurs (2016), ont réalisé leurs cinétiques dans un tampon contenant 30 mM de Bris-Tris propane et 30 mM d'acide 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonique), alors que nous avons utilisé un tampon Tris HCl. Ainsi, AtALDH10A8 et AtALDH10A9 sont capables d'oxyder l'ABAL, et pourraient donc être impliquées dans la production de GABA.

iii. Activité sur le TMABAL

L'étude des activités enzymatiques montre que AtALDH10A8 et AtALDH10A9 sont capables d'oxyder le TMABAL. Leur affinité pour le TMABAL est cependant inférieure à celle de SIAMADH1 et ZmAMADH2. Le Trp288 pourrait être responsable de cette activité moindre sur le TMABAL. Ce résidu gêne la fixation du groupe triméthylammonium du TMABAL. L'inhibition de l'activité des deux isoenzymes par des concentrations de TMABAL supérieures à 50 mM a également été rapportée pour les trois ALDH10 du maïs (ZmAMADH1a, ZmAMADH1b et ZmAMADH2) et pour SIAMADH1 (Kopečný *et al.* 2013). Le K_m de AtALDH10A9 avec le TMABAL (6,3 μM) est proche de celui de ZmAMADH1a (6 μM) (Kopečný *et al.* 2013). Celui de AtALDH10A8 (14,8 μM) est comparable à celui de PsAMADH1 (10 μM), ZmAMADH2 (16 μM) et SIAMADH1 (17 μM) (Kopečný *et al.* 2013). La V_{\max} de AtALDH10A8 (116,9 nkat mg^{-1}) est plus proche de celle de PsAMADH2 (140 nkat mg^{-1}) que de celle de PsAMADH1 (87 nkat mg^{-1}). En revanche celle de AtALDH10A9 (26,7 nkat mg^{-1}) est plus faible.

AtALDH10A8 et AtALDH10A9 sont donc capables d'oxyder efficacement le TMABAL. Les deux isoenzymes pourraient ainsi être impliquées dans la synthèse de γ -butyrobétaine, le précurseur direct de la carnitine chez les animaux et les levures (Vaz and Wanders 2002; Strijbis

et al. 2009, 2010). AtALDH10A8 serait plus active que AtALDH10A9 sur les faibles concentrations de TMABAL.

iv. Activité sur la BAL

Les deux isoformes sont faiblement actives avec la BAL. Ce résultat n'est pas en accord avec ceux de Missihoun et ses collaborateurs (2011) qui ont rapporté une haute activité de AtALDH10A9 avec la BAL. En revanche, il confirme ceux rapportés par Zarei et ses collaborateurs (2016). Cette faible activité peut être expliquée par l'Ile444, qui est partagée par les ALDH10 de la tomate, ZmAMADH1b, ZmAMADH2 (Kopečný *et al.* 2013) et les ALDH10 du pommier (Zarei *et al.* 2015), elles aussi faiblement actives avec la BAL. Ce résidu réduit la largeur du canal du substrat (Kopečný *et al.* 2013). Il limite donc l'interaction de l'enzyme avec la fonction triméthylammonium de la BAL. En revanche, les ALDH10 spécialisées dans l'oxydation de la BAL, comme SoBADH1, sont dépourvues de cette Ile444. Si AtALDH10A8 et AtALDH10A9 sont capables d'oxyder la BAL en glycine bêtaïne, elles ne sont probablement pas dédiées à cette activité *in vivo*.

v. pH optimaux

Les résultats obtenus montrent que les pH optimaux pour l'activité des ALDH10 d'Arabidopsis varient selon l'isoforme et le substrat. Néanmoins, pour chacun des trois substrats testés, l'APAL, l'ABAL et le TMABAL, le pH optimal d'ALDH10A8 (10,4 ; 10,0 et 10,7, respectivement) est supérieur de 0,7 ou 0,8 point au pH optimal d'ALDH10A9 (9,7 ; 9,2 et 10,0, respectivement). Quel que soit le substrat, ALDH10A8 est donc active dans des conditions plus alcalines que AtALDH10A9. Ce résultat est proche de celui obtenu par Zarei et ses collaborateurs. Selon eux, le pH optimal de AtALDH10A8 et AtALDH10A9 avec l'APAL est de 10,5 et 9,5, respectivement. Ces pH optimaux ne semblent pas correspondre au pH des organites dans lesquels ils sont localisés. Le pH du peroxyosome, dans lequel se trouve ALDH10A9 (Missihoun *et al.* 2011; Zarei *et al.* 2016) est de 8,4 (Shen *et al.* 2013), soit proche du pKa de la cystéine catalytique. Concernant AtALDH10A8, Missihoun et ses collaborateurs (2011) ont proposé qu'elle serait localisée dans les leucoplastes. Zarei et ses collaborateurs (2016) estiment qu'elle serait localisée dans les plastes en général. Le pH du chloroplaste est de 7,2 (Shen *et al.* 2013), soit plus acide que le pH optimal de AtALDH10A8. Toutefois ces estimations de valeurs de pH concernent l'organe entier. On ne peut exclure une variation de pH à l'intérieur des organites, voir au niveau du site catalytique.

b. Implications potentielles des AtALDH10 dans la physiologie de la plante

i. Dégradation des polyamines et des acides aminés

L'APAL et l'ABAL sont des intermédiaires de dégradation des polyamines : la spermine, la spermidine et la putrescine (Sebela *et al.* 2000; Li *et al.* 2003). Le GBAL est issu de la décomposition de l'arginine, le TMABAL de la lysine et la BAL de la choline (Brouquisse *et al.* 2008). Ces aminoaldéhydes sont des molécules hautement réactives et par conséquent toxiques pour la cellule. La cytotoxicité de l'APAL et l'ABAL a par ailleurs été montrée chez l'animal (Yu *et al.* 2003; Wood *et al.* 2007). Les expériences réalisées ici montrent que les ALDH10 d'*Arabidopsis* sont capables d'oxyder l'APAL, l'ABAL, le GBAL, le TMABAL et la BAL. Cela suggère que les AtALDH10 sont impliquées dans la détoxification de ces intermédiaires de dégradation des polyamines et acides aminés, et leur conversion en β -alanine, GABA, 4-guanidinobutyrate, γ -butyrobétaine et glycine bétaine, respectivement. En outre, ces molécules pourraient intervenir dans plusieurs processus physiologiques, comme la protection contre le stress osmotique ou la voie de biosynthèse de la carnitine.

ii. Protection contre le stress osmotique

Chez les plantes, les ALDH10 sont impliquées dans la synthèse de plusieurs osmoprotectants. Chez l'épinard notamment, les ALDH10 sont responsables de la conversion de la BAL en glycine bétaine (Weigel *et al.* 1986; Weretilnyk and Hanson 1989). Cette dernière peut s'accumuler à des concentrations élevées dans les tissus de plantes en réponse à un stress osmotique (Le Rudulier *et al.* 1984; Sakamoto and Murata 2000). Bien que les AtALDH10 permettent de synthétiser la glycine bétaine (Missihoun *et al.* 2011, 2015), *Arabidopsis* n'accumule pas ce composé en réponse à un stress osmotique. Cela est en partie lié à l'absence de choline monooxygénase fonctionnelle, l'enzyme transformant la choline en bétaine aldéhyde (Hayashi *et al.* 1997, Huang *et al.* 2000). Cette absence est, de plus, accompagnée de la très faible activité des AtALDH10 sur la BAL montrée ici. En revanche, leur capacité à oxyder l'APAL et l'ABAL suggère qu'elles seraient impliquées dans la production de β -alanine et de GABA. Ces deux molécules ont, comme la glycine bétaine, des propriétés d'osmoprotection (Kasschau *et al.* 1984; Hanson *et al.* 1994; Kinnersley and Turano 2000; Shelp *et al.* 2012). Il est donc possible que chez *Arabidopsis*, les ALDH10 puissent être impliquées dans la synthèse de β -alanine et de GABA pour protéger la plante contre le stress osmotique.

iii. Synthèse de γ -butyrobétaine

La capacité d'AtALDH10A8 et AtALDH10A9 à oxyder le TMABAL *in vitro* suggère que ces deux enzymes pourraient être impliquées dans la synthèse de la γ -butyrobétaine chez Arabidopsis. Au cours d'une thèse réalisée antérieurement dans notre équipe, la levure mutante *C. albicans tmabadh* (*tmabadh* Δ/Δ), déficiente pour l'enzyme responsable de la synthèse de γ -butyrobétaine, a été étudiée (Zhao, 2014). Une complémentation fonctionnelle de ce mutant par les enzymes AtALDH10A8 et AtALDH10A9 a été démontrée. Cette étude a permis de proposer que les ALDH10 d'Arabidopsis pourraient être impliquées dans la synthèse de γ -butyrobétaine chez la plante. Les résultats ici présentés renforcent cette hypothèse tout en montrant une possible implication dans d'autres voies métaboliques. Il faut noter également que l'ALDH7 et l'ALDH12 du maïs peuvent aussi prendre en charge le TMABAL, bien qu'il ne soit pas leur substrat de prédilection (Koncitikova et al. 2015). Il est donc possible que d'autres ALDH chez Arabidopsis participent à la synthèse de γ -butyrobétaine. La γ -butyrobétaine étant le précurseur direct de la carnitine chez les animaux et les levures, AtALDH10A8 et AtALDH10A9 pourraient donc intervenir dans la biosynthèse de la carnitine *via* la conversion du TMABAL en γ -butyrobétaine.

B. Etude du rôle biologique des enzymes AtALDH10A8 et AtALDH10A9

Les enzymes AtALDH10A8 et AtALDH10A9 sont capables d'oxyder plusieurs aminoaldéhydes. Elles peuvent notamment convertir l'ABAL en GABA et le TMABAL en γ -butyrobétaine (Chapitre A). Le GABA est une molécule impliquée notamment dans la protection contre le stress osmotique (Shelp *et al.* 1999; Kinnersley and Turano 2000). La γ -butyrobétaine est, chez les animaux et les levures, le précurseur direct de la carnitine, et pourrait avoir le même rôle chez les plantes (Rippa *et al.* 2012). Une étude de mutants AtALDH10 a donc été réalisée pour étudier le rôle biologique de ces enzymes dans la défense contre le stress osmotique, la biosynthèse de la carnitine, ou d'autres processus physiologiques. Un mutant perte de fonction est disponible pour chacune des deux isoformes AtALDH10. Le mutant d'insertion *KO8-2* (Missihoun *et al.* 2011), identifié dans la collection Saskatoon (SK24056) (Robinson *et al.* 2009), porte un T-DNA dans le douzième intron du gène *AtALDH10A8* (Figure 21). Le mutant *badh* (SAIL543H01), identifié dans la collection de mutants d'insertion Syngenta Arabidopsis insertion library (SAIL, www.tmri.org), porte un T-DNA dans la séquence codante du gène *AtALDH10A9*, au niveau du deuxième exon (Cassin-Ross and Hu 2014).

Dans le cadre de cette thèse, l'expression des gènes *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* a été vérifiée chez Col-0, *KO8-2* et *badh*. Ensuite, le double mutant *KO8-2 badh*, perte de fonction pour les deux AtALDH10, a été généré. La morphologie et le développement précoce des plantes Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* ont été caractérisés. La capacité des extraits protéiques des plantes à oxyder l'ABAL et le TMABAL, substrats des AtALDH10, a été mesurée. Enfin, la teneur des tissus des plantes en carnitine, γ -butyrobétaine et GABA a été déterminée. Ces expériences ont pour objectif de connaître plus précisément les processus physiologiques dans lesquels les AtALDH10 pourraient être impliquées. Elles doivent notamment permettre de confirmer ou infirmer l'implication des AtALDH10 dans le métabolisme du GABA, de la γ -butyrobétaine et de la carnitine.

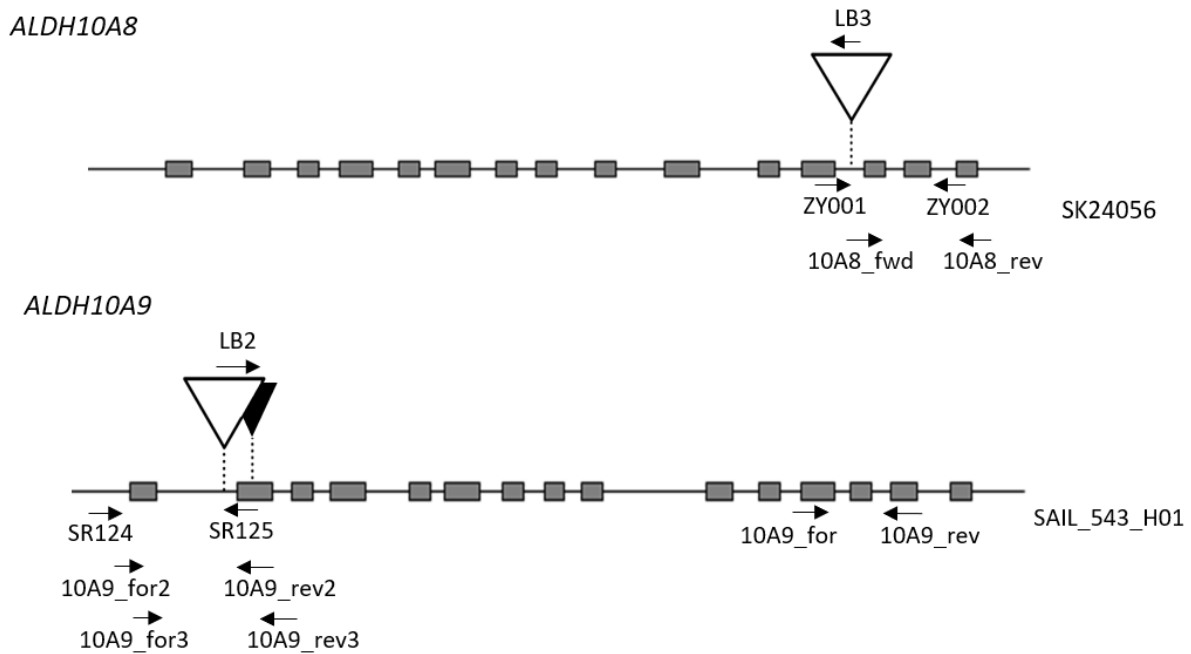


Figure 21 : Structure intron-exon des gènes *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* et position des T-DNA chez les mutants *KO8-2* et *badh*. Les noms des lignées portant les T-DNA sont indiqués. Les rectangles représentent les exons. Les lignes représentent les introns et les régions non traduites en 5' et 3'. Les triangles blancs représentent les T-DNA chez les mutants *KO8-2* et *badh*. Un triangle noir en arrière-plan représente la position du T-DNA chez *badh* selon Cassin-Ross & Hu, 2014. Les flèches indiquent la position des amorces utilisées pour le génotypage, pour déterminer la position du T-DNA chez le mutant *badh*, et pour les RT-PCR quantitatives chez *badh*.

1. Etude préliminaire des mutants *KO8-2* et *badh*

a. Analyse de l'expression de *AtALDH10A9* chez le mutant *badh*

La perte de fonction du mutant *KO8-2* pour *AtALDH10A8* a été confirmée lors d'un travail précédent (Zhao, 2014). Dans un premier temps, nous avons souhaité vérifier que *badh* est également un mutant perte de fonction. Les ARN des feuilles de rosettes de Col-0 et *badh* âgées de 2 semaines ont été extraits et une expérience de RT-PCR quantitative a été réalisée pour *AtALDH10A9*. Plusieurs couples d'amorces ont été utilisés. Un couple d'amorces spécifique de la partie 3' du gène *AtALDH10A9* (10A9_for et 10A9_rev), a été utilisé. Deux couples spécifiques de la partie 5' de *AtALDH10A9* ont également été utilisés : 10A9_for2 et 10A9_rev2 ; et 10A9_for3 et 10A9_rev3. L'analyse par RT-PCR quantitative avec un couple d'amorces en 5' confirme l'absence d'expression de *AtALDH10A9* chez *badh* (Figure 22). Cependant, un niveau d'expression de *AtALDH10A9* comparable à celui de Col-0 est détecté par RT-PCR quantitative utilisant un couple d'amorces spécifique de la partie 3' du gène

(Figure 22). Ainsi, chez le mutant *badh*, la partie 3' du gène *AtALDH10A9* est exprimée, malgré la présence de l'insertion T-DNA en 5' du gène.

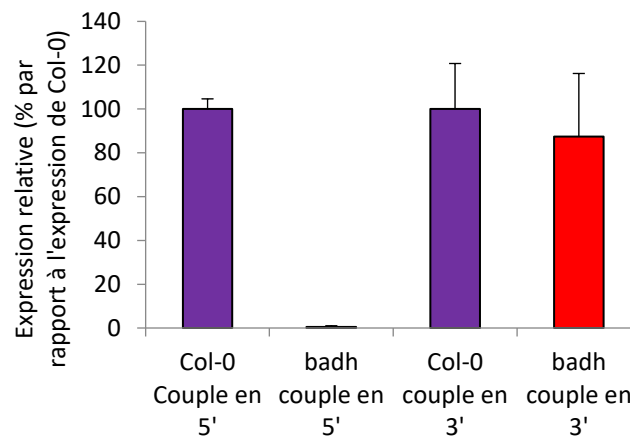


Figure 22 : Analyse de l'expression de *AtALDH10A9* dans les feuilles de Col-0 et *badh* âgées de 2 semaines, avec un couple d'amorces s'hybridant au niveau de la partie 5' du gène (à gauche sur la figure) et avec un couple s'hybridant au niveau de la partie 3' du gène (à droite sur la figure).

b. Position du T-DNA chez le mutant *badh*

Les analyses par RT-PCR montrent que la partie 3' du gène *AtALDH10A9* est transcrite. Une analyse préliminaire s'est donc révélée nécessaire pour vérifier si chez *badh*, le T-DNA est présent dans un exon, comme indiqué dans la littérature (Cassin-Ross & Hu 2014). La position du T-DNA dans le gène *AtALDH10A9* chez le mutant *badh* a donc été vérifiée. L'ADN de feuille de *badh* a été extrait, et la région bordant le T-DNA a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces LB2 et SR125. LB2 reconnaît une séquence située sur la bordure gauche du T-DNA. SR125 s'hybride au niveau du gène (Figure 21). L'amplicon ainsi généré a été cloné dans le vecteur de clonage pGEM[®]-T Easy, puis séquencé par les amorces de séquençage SP6 et T7 du plasmide.

Après alignement avec la séquence du gène *AtALDH10A9*, le résultat montre que, **chez le mutant *badh*, le T-DNA est situé dans le premier intron** (Figure 23), et non dans le deuxième exon.

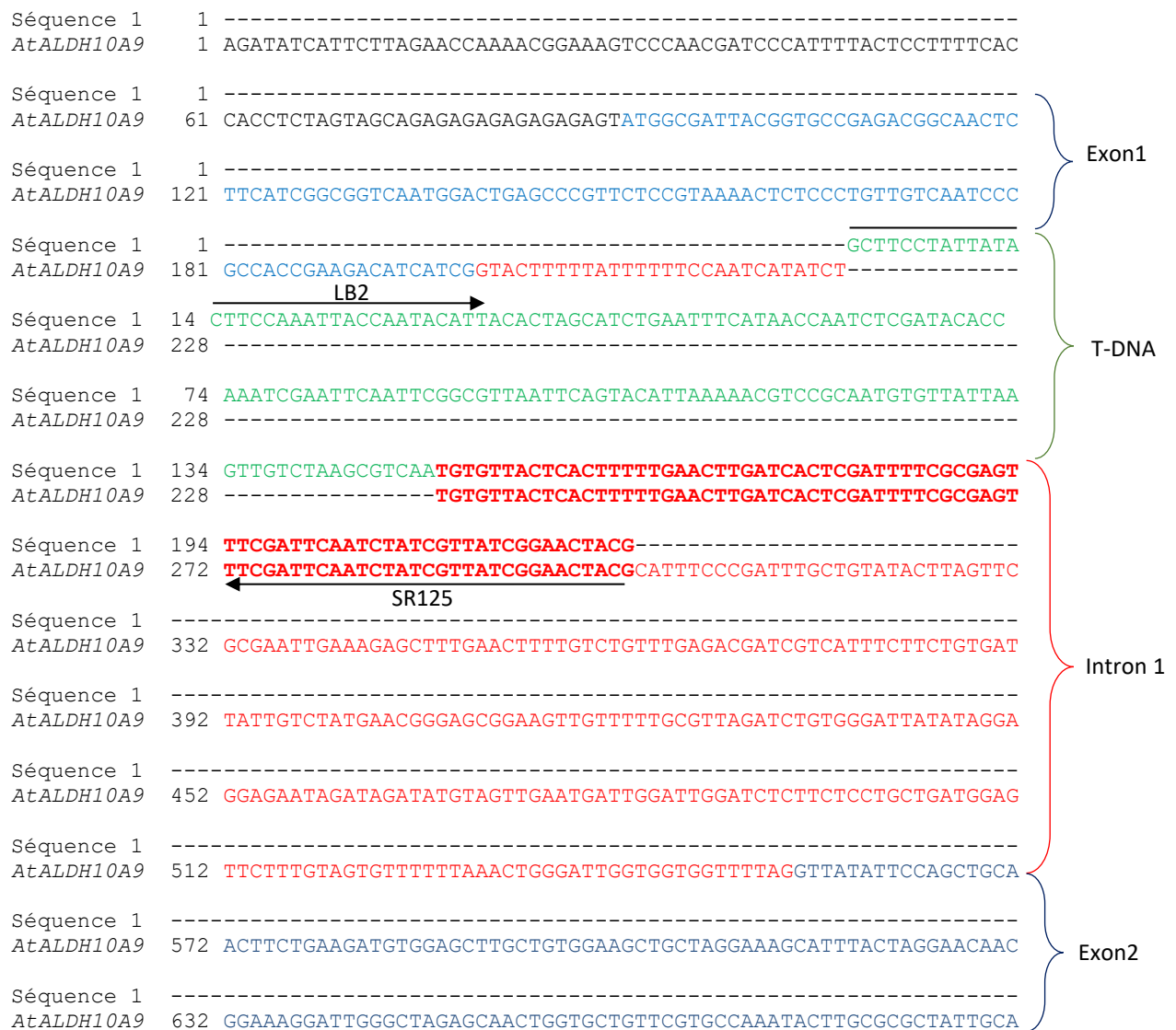


Figure 23 : Alignement de la séquence de l'amplicon généré par PCR en utilisant les amorces LB2 et SR125 chez le mutant *badh* (noté Séquence 1), avec les 930 premiers nucléotides de la séquence du gène *AtALDH10A9*. Les séquences des régions non traduites sont présentées en noir, celles des exons sont présentées en bleu, et celles des introns sont présentées en rouge. La séquence du T-DNA est présentée en vert. Les flèches représentent la position des amorces LB2 et SR125. Les nucléotides identiques entre les deux séquences sont présentés en gras. Les numéros en début de ligne indiquent les positions des nucléotides.

c. Etude de l'expression des gènes *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* chez *KO8-2* et *badh*

Chez les simples mutants *KO8-2* et *badh*, il est possible que la perte de fonction pour une ALDH10 soit compensée par une surexpression du gène codant l'autre isoenzyme. Pour vérifier cette hypothèse, le nombre de transcrits *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* chez *KO8-2* et *badh* a été analysé par RT-PCR quantitative. Les ARN des feuilles de rosettes de Col-0 et *badh* âgées de 7 jours ont été extraits et une expérience de RT-PCR quantitative a été réalisée. Les amorces

10A8_fwd et 10A9_rev ont été utilisées pour amplifier le cDNA de *AtALDH10A8*. Les amorces 10A9_for et 10A9_rev ont été utilisées pour amplifier le cDNA de *AtALDH10A9*. L'analyse par RT-PCR quantitative indique que *AtALDH10A8* est exprimé de manière similaire chez Col-0 et *badh* (Figure 24 A), et *AtALDH10A9* est exprimé de manière similaire chez Col-0 et *KO8-2* (Figure 24 B). **Ainsi, la perte de fonction d'une *AtALDH10* n'entraîne pas une surexpression de l'autre isoenzyme.**

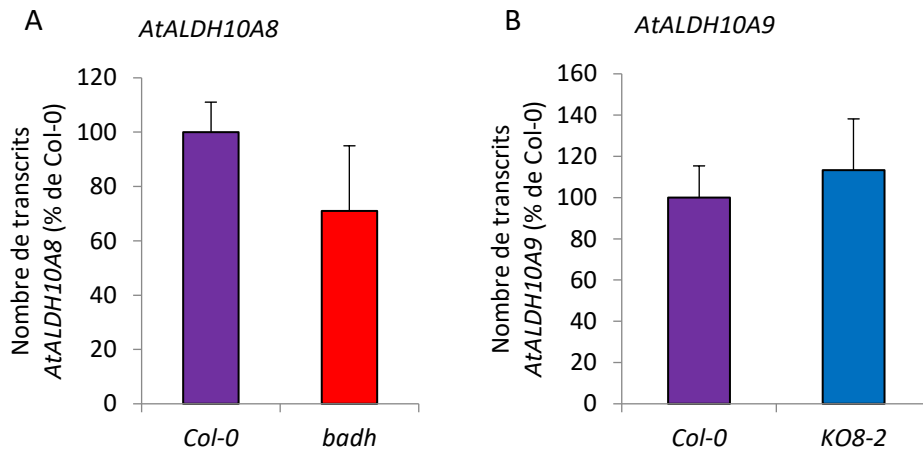


Figure 24 : Analyse de l'expression de *AtALDH10A8* dans les feuilles de rosettes de Col-0 et *badh* (A), et de *AtALDH10A9* dans les feuilles de rosettes de Col-0 et *KO8-2* (B) par RT-PCR quantitative. Les niveaux d'expression des gènes sont donnés en % du niveau d'expression chez Col-0. Dans les deux cas, les feuilles de rosettes ont été prélevées sur des plantes âgées de 2 semaines.

2. Etude du double mutant *KO8-2 badh*

a. Obtention du double mutant *KO8-2 badh*

Dans la mesure où il n'existe pas d'autre mutant que *badh* disponible dans la littérature ou dans les banques perte de fonction pour *AtALDH10A9*, et que des phénotypes ont été décrits pour cette lignée (Cassin-Ross and Hu 2014; Zhao 2014), le mutant *badh* a été utilisé dans cette étude. Tout d'abord, *badh* a été croisé avec *KO8-2*. Ce croisement de manière à créer un double mutant *KO8-2 badh*. Un premier croisement a permis d'obtenir une lignée hétérozygote pour chacune des deux mutations. Le double mutant a ensuite été obtenu par autofécondation de ce double hétérozygote. Les plantes double hétérozygotes, puis les doubles homozygotes *KO8-2 badh* ont été identifiées au moyen d'un génotypage par PCR utilisant trois amorces.

Les amorces ZY001, ZY002 et LB3 sont utilisées pour suivre le T-DNA de l'allèle *KO8-2*. ZY001 et LB3 permettent de générer un amplicon de 550 pb pour l'allèle *KO8-2* (portant le T-

DNA), et les amorces ZY001 et ZY002 permettent de générer un amplicon de 700 pb pour l'allèle sauvage. De la même manière, les amorces SR124, SR125 et LB2 sont utilisées pour suivre le T-DNA de l'allèle *badh*. Les amorces SR124 et SR125 permettent de générer un amplicon de 500 pb pour l'allèle sauvage, et les amorces SR124 et LB2 permettent de générer un amplicon de 200 pb pour l'allèle *badh* (portant le T-DNA). Le génotypage a permis d'identifier des plantes homozygotes à la fois pour l'allèle *KO8-2* et pour l'allèle *badh* (Figure 25 A et B). Ainsi, **des plantes *KO8-2 badh* ont été obtenues.**

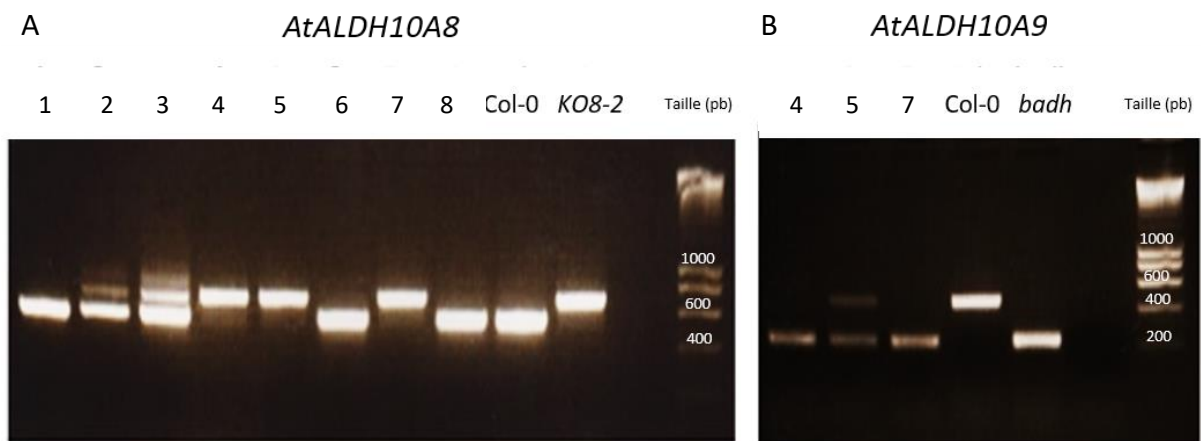


Figure 25 : Electrophorèse des produits de PCR de génotypage sur les gènes *AtALDH10A8* en utilisant les amorces ZY001, ZY002 et LB3 (A) et *AtALDH10A9* en utilisant les amorces SR124, SR125 et LB2 (B) des plantes issues du croisement, pour l'identification des mutants *KO8-2* et *badh*. Les plantes issues du croisement sont identifiées par un numéro. Celles dont le profil électrophorétique montre l'homozygotie pour les mutations *KO8-2* et *badh* (double mutant *KO8-2 badh*) sont encadrés en rouge.

b. Caractérisation de la morphologie de la plante adulte

La descendance de quatre plantes double mutantes *KO8-2 badh*, numérotées 6, 18, 46 et 49, a été étudiée du point de vue développemental et biochimique. Dans ce mémoire, les résultats de chaque descendance sont présentés avec le numéro correspondant. Pour des raisons pratiques, la plupart des analyses n'ont pas été réalisées sur les descendances de chacune de ces lignées.

La taille de la hampe florale des plantes adultes Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* a été mesurée et comparée. La hampe florale de Col-0, *KO8-2* et *badh* est de taille similaire, en moyenne 53 cm. Celle du double mutant *KO8-2 badh* mesure en moyenne 68 cm, soit une hauteur 28 % supérieure à celle de Col-0 et des simples mutants (Figure 26). **Le double mutant *KO8-2 badh* forme donc une hampe florale significativement plus grande que Col-0, *KO8-2* et *badh*.**

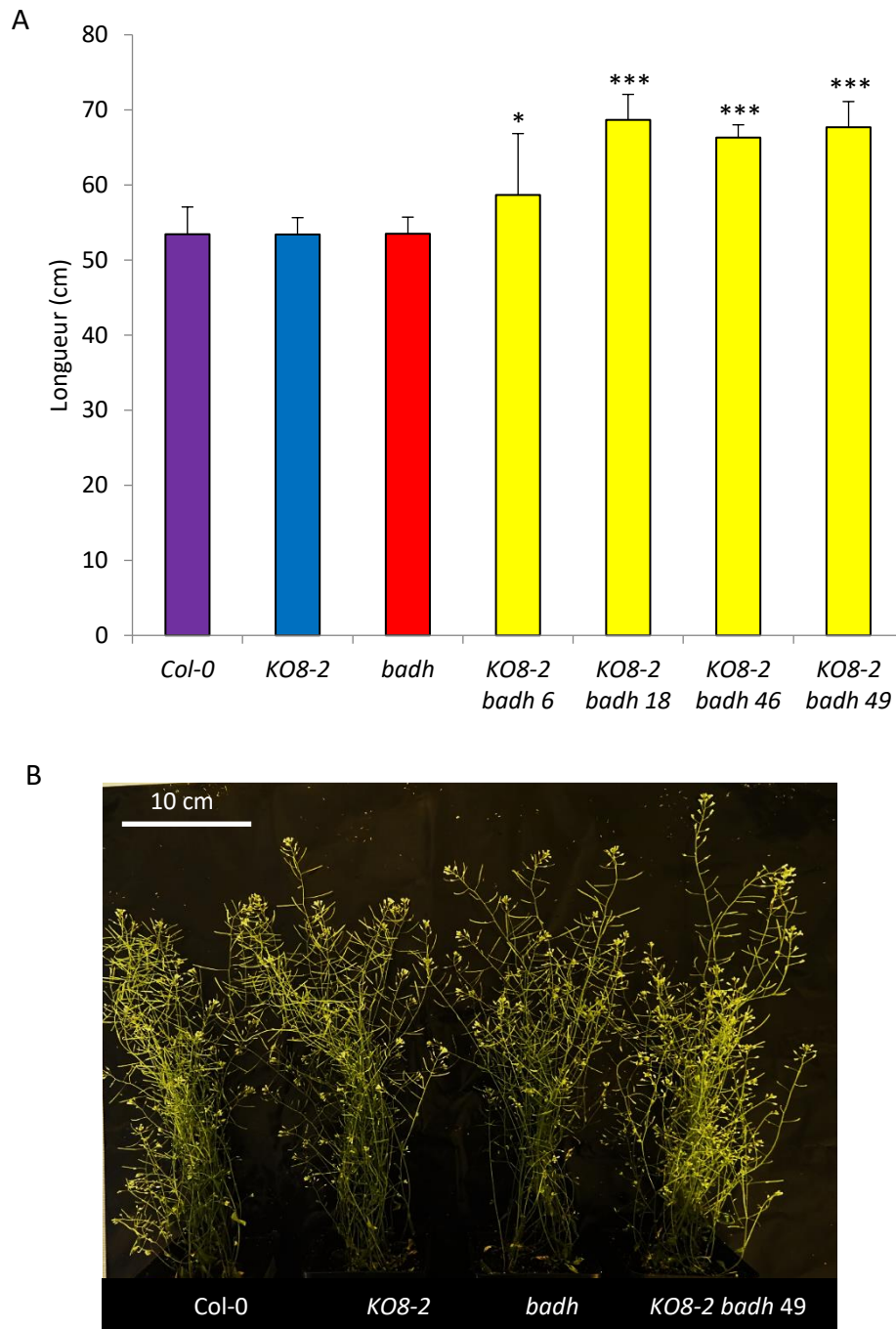


Figure 26 : Longueur en cm de la hampe florale de *Col-0*, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* (A) et photographie des plantes adultes *Col-0*, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* âgées de 7 semaines (B). Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et *Col-0* en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

Le nombre de hampes florales secondaires a également été comparé. Entre les plantes *Col-0*, *KO8-2* et *badh*, ce nombre ne diffère pas significativement. Elles portent en moyenne entre

28 et 37 hampes florales secondaires. Les lignées *KO8-2 badh* porte en moyenne jusqu'à 187 hampes florales secondaires (pour la lignée 49) (Figure 27 A), soit 5 à 7 fois plus que Col-0 et les simples mutants. En particulier, *KO8-2 badh* porte en moyenne jusqu'à 104 hampes florales secondaires (pour la lignée 49) de moins de 15 cm, soit environ 11 fois plus que Col-0, *KO8-2* et *badh* (Figure 27 B). **Ainsi, le double-mutant *KO8-2 badh* génère un nombre significativement plus élevé de hampes florales secondaires, et en particulier un nombre plus élevé de hampes florales secondaires de petite taille.**

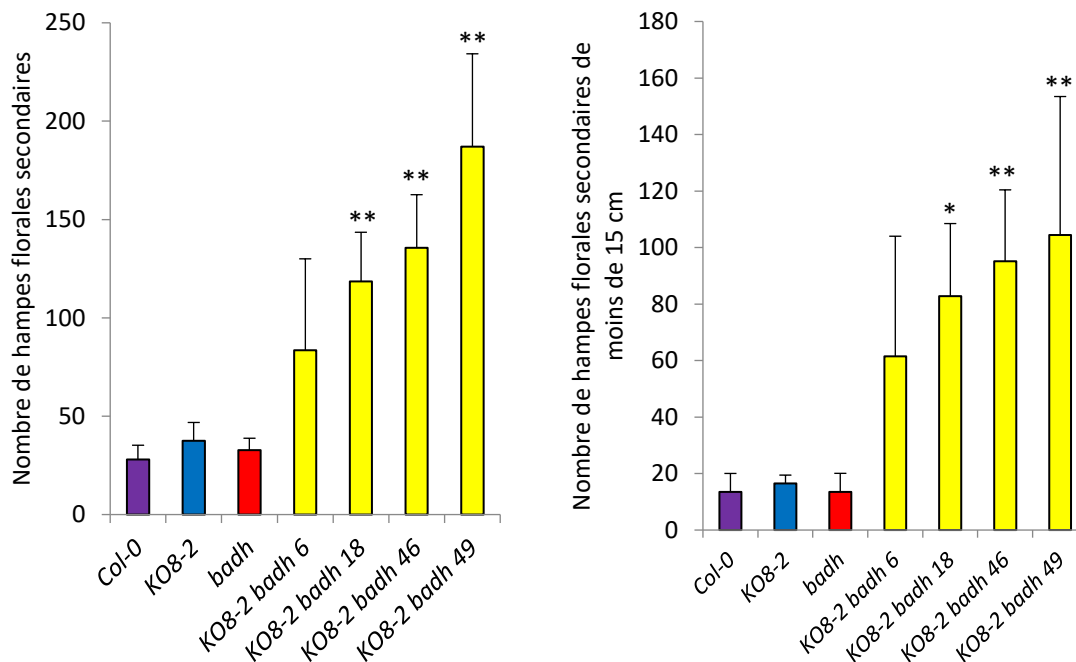


Figure 27 : Nombre de hampes florales secondaires totales (A), et nombre de hampes florales secondaires de moins de 15 cm (B) de Col-0, des simples mutants *KO8-2* et *badh* et des double mutants *KO8-2 badh* âgées de 7 semaines. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

Les siliques matures de Col-0, *KO8-2* et *badh* mesurent en moyenne 13,7 à 13,9 mm (Figure 28 A). Elles comportent respectivement 48, 46 et 38 graines développées en moyenne (Figure 28 B). Les siliques de *KO8-2 badh* mesurent en moyenne 6,7 à 8,6 mm selon les lignées (Figure 28 A), soit une longueur 50 % inférieure à celle des plantes sauvages ou des simples mutants. Elles comportent entre 25 et 40 ovules ne donnant pas de graines développées, soit 50 à 80 % des ovules. Elles portent également entre 9 et 24 graines développées par silique selon les lignées (Figure 28 B), soit 50 à 80 % de moins par rapport à Col-0.

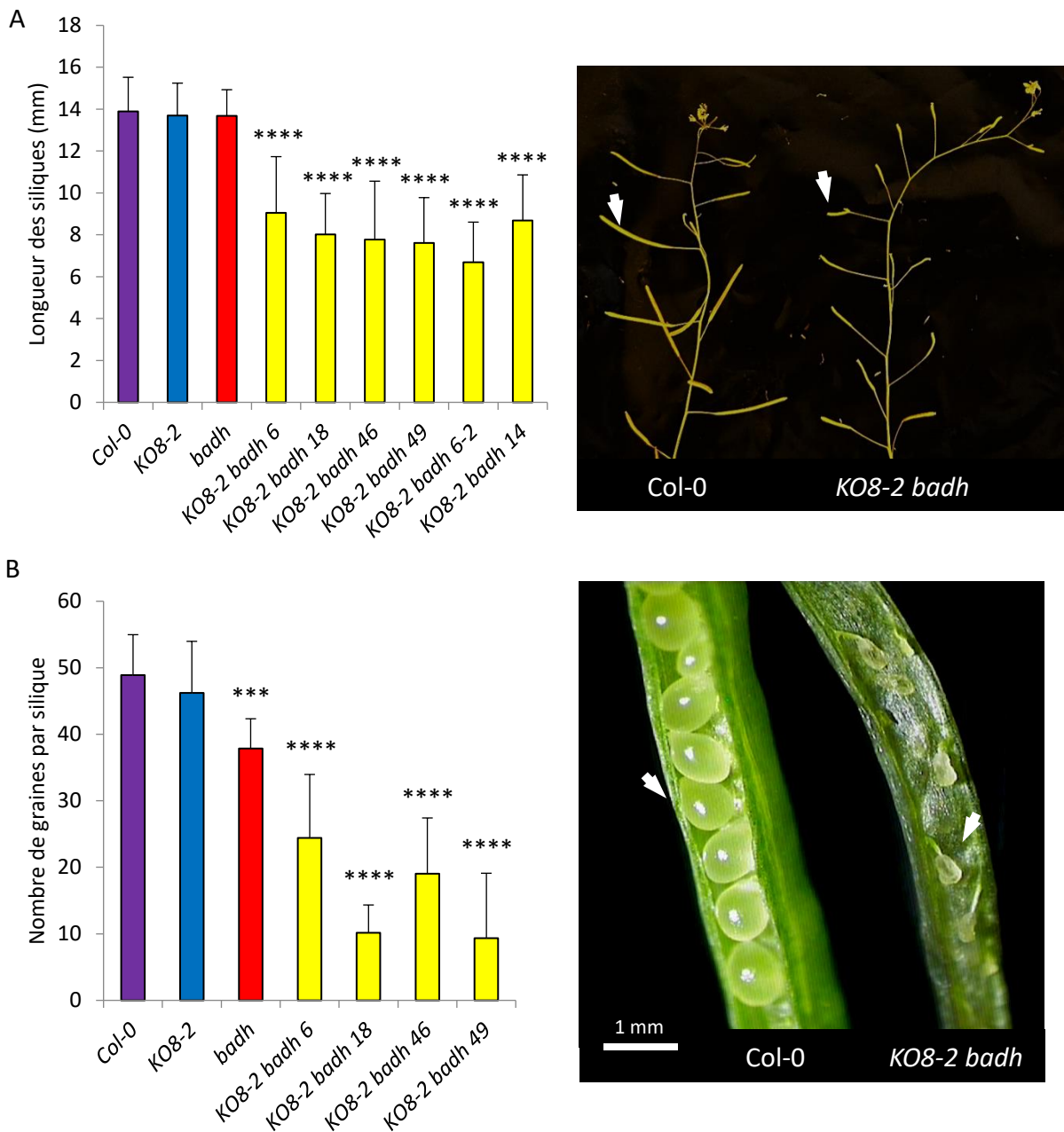


Figure 28 : Longueur de la silique (A) et nombre de graines bien développées par silique (B) chez des plantes Col-0, KO8-2, badh et KO8-2 badh âgées de 7 semaines. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 30 et 10 expérimentations biologiquement indépendantes, respectivement. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

En résumé, le double mutant KO8-2 badh est caractérisé par une hampe florale plus grande et une production de hampes florales secondaires plus importante. Ses siliques

sont de taille inférieure aux autres génotypes, et contiennent un nombre de graines significativement réduit (Tableau 13).

Tableau 13 : Principales caractéristiques du double mutant *KO8-2 badh* par rapport à Col-0 concernant la morphologie de la plante adulte.

	Phénotype de <i>KO8-2 badh</i> par rapport à Col-0
Hampe florale	28 % plus grande
Hampes florales secondaires	De 5 à 7 fois plus nombreuses
Longueur des siliques	Réduite de 50 %
Nombre de graines développées	Réduit de 50 à 80 %

c. Etude de la résistance au stress salin

Plusieurs études ont suggéré l'existence d'un lien entre les ALDH10 et la résistance au stress salin chez les plantes. En effet, les ALDH10 peuvent être impliquées dans la production d'osmoprotectants, tels que la glycine bêtaïne, la β -alanine ou le GABA (Fitzgerald *et al.* 2009; Tylichová *et al.* 2010; Kopečný *et al.* 2013; Zarei *et al.* 2016). Chez *Arabidopsis*, des études ont montré que les simples mutants *KO8-2* et *badh* montrent une sensibilité accrue au stress salin (Missihoun *et al.* 2011; Zarei *et al.* 2016). L'effet de l'exposition au stress salin sur les plantes des quatre génotypes a été étudié ici. Les plantes ont été cultivées en pot (9 plantes par pot). A partir de 14 jours après germination, elles ont été arrosées tous les deux jours avec 100 ml d'eau ou une solution de 50, 75 ou 100 mM NaCl. Pour estimer l'impact du stress salin sur les plantes, la hauteur de la hampe florale a été mesurée après 14 jours de traitement (Figure 29).

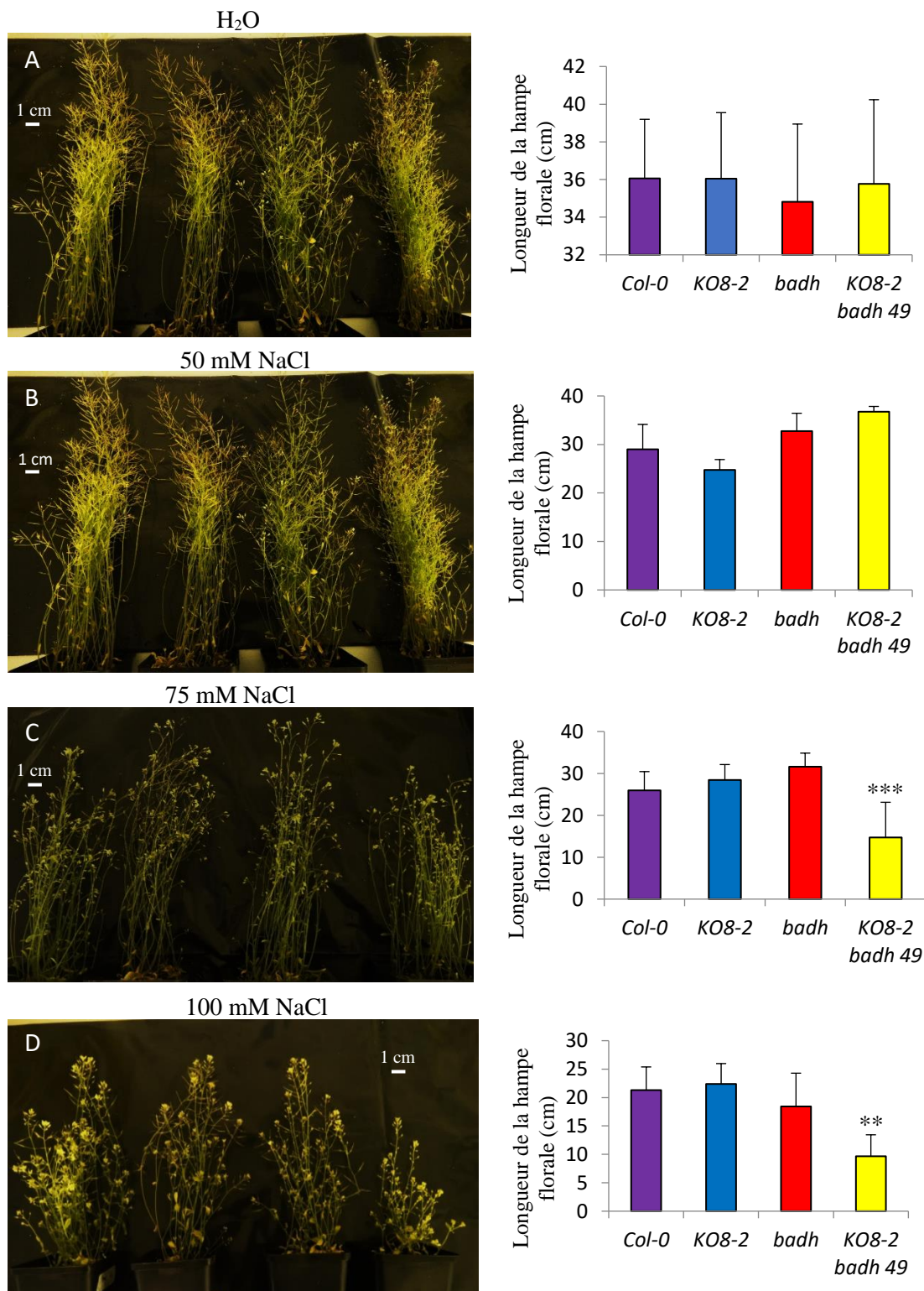


Figure 29 : Effet de la salinité sur les plantes de Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* (lignée 49) âgées de 4 semaines : photographie des plantes à l'issue du traitement, et longueur moyenne de la hampe florale. Plantes arrosées avec de l'eau (A), 50 mM NaCl (B) 75 mM NaCl (C) et 100 mM NaCl (D). Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

Chez les plantes cultivées en conditions normales ou avec 50 mM NaCl, la hauteur des hampes florales de Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* est de 36 et 30 cm, respectivement. Elle est comparable entre les quatre génotypes (Figure 29 A et 29 B). Concernant les plantules arrosées avec 75 mM NaCl, la hauteur des hampes florales de Col-0, *KO8-2* et *badh* est de 25 à 30 cm environ. Celles de *KO8-2 badh* est de 15 cm, soit 40 % inférieure environ. Concernant les plantules arrosées avec 100 mM NaCl, la hauteur des hampes florales de Col-0, *KO8-2* et *badh* est de 20 cm environ. Celle de *KO8-2 badh* est 10 cm, soit réduite de 50 % par rapport aux autres génotypes (Figure 29 C et 29 D). **Ainsi, *KO8-2 badh* est plus sensible au stress salin que Col-0, *KO8-2* et *badh*. Dans nos conditions de culture, ce n'est en revanche pas le cas des simples mutants *KO8-2* et *badh*.**

d. Caractérisation du développement précoce

Le développement post-germinatif de la plantule repose sur la mobilisation de réserves carbonées, stockées sous forme de lipides, d'amidon et de protéines. Chez *Arabidopsis*, la réserve est principalement constituée de triacylglycérols (TAG), à raison de 40 % de la masse de la graine (Zhai *et al.* 2017), dans les cotylédons et l'endosperme, ainsi que de protéines. La réserve d'amidon, en revanche, est rapidement consommée durant la phase de morphogenèse de l'embryon et les graines matures en contiennent peu (Baud *et al.* 2002; Angeles-Núñez and Tiessen 2011). Durant la phase de développement précoce de la plantule, les TAG sont dégradés, ce qui permet de fournir l'énergie indispensable à son développement jusqu'à l'acquisition de la photoautotrophie (Eastmond and Graham 2001). L'eicosénoate (C20:1) est le marqueur de dégradation des TAG (Li-Beisson *et al.* 2013). Le développement de la plantule requiert également la synthèse de lipides membranaires. Chez les plantes, les acides gras sont synthétisés dans les plastes (Ohlrogge and Browse 1995). Ils sont ensuite exportés vers le réticulum endoplasmique au sein duquel ils sont utilisés pour la synthèse de lipides membranaires (Ohlrogge and Browse 1995). Cependant, l'hexadécatriénoate (C16:3), un composant des lipides membranaires des thylakoïdes (Kaup *et al.* 2002), est synthétisé au sein-même du plaste. Il est donc utilisé comme marqueur de la synthèse plastidiale d'acides gras (Li-Beisson *et al.* 2013).

Le développement précoce des plantules Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* a été caractérisé. La vitesse du développement précoce a été comparée. La quantité totale en acides gras, amidon et protéines, et leur teneur par rapport à la matière sèche, ont été dosées dans les graines et les

plantules. Une attention particulière a été apportée à l'eicosénoate pour étudier la dégradation des TAG, et à l'hexadécatriénoate, pour estimer la synthèse membranaire.

i. Vitesse du développement précoce

Le développement précoce de Col-0, des simples mutants *KO8-2* et *badh* et du double mutant *KO8-2 badh* a été caractérisé. Concernant ce dernier, les lignées *KO8-2 badh* 18, 46 et 49 ont été étudiées et sont présentées ensemble. Des stades de développement ont été définis. Le premier correspond à la sortie de la radicule. Le deuxième concerne l'émergence, puis l'étalement des cotylédons. Le stade suivant est caractérisé par l'émergence, puis l'étalement de la première paire de feuilles. Le dernier stade correspond à l'apparition de la deuxième paire de feuilles. La proportion de plantules à chaque stade de développement décrit précédemment a été quantifiée.

Seules les graines développées ont été étudiées ici. Celles dont le développement est avorté restent dans la silique et ne sont pas récoltées. Tout d'abord, un certain nombre de graines sont incapables de germer. C'est le cas de 1 % des graines de *KO8-2* et *badh*, et de 1 % des graines de *KO8-2 badh*. Chez Col-0, toutes les graines germent (Figure 30). **Ainsi, le nombre de graines incapables de germer chez *KO8-2 badh* est plus élevé que chez Col-0, *KO8-2* et *badh*.** Après deux jours de développement, les cotylédons apparaissent, et les plantules ayant les cotylédons complètement sortis sont considérées comme les plus développées. Ce stade de développement concerne 6 à 7 % des plantules Col-0 et *KO8-2*, 20 % des plantules *badh* et 42 % des plantules *KO8-2 badh* (Figure 30 A). A 4 jours de développement, les plantules les plus avancées sont celles dont la première paire de feuilles est complètement sortie et étalée. Ce stade de développement concerne 43 % des plantules Col-0, 53 % des plantules *KO8-2*, 52 % des plantules *badh* et 66 % des plantules *KO8-2 badh* (Figure 30 B). A 7 jours de développement, les plantules les plus avancées sont celles dont la deuxième paire de feuilles est complètement sortie. Ce stade de développement concerne 17 % des plantules Col-0, 11 % des plantules *KO8-2*, 13 % des plantules de *badh* et 48 % des plantules *KO8-2 badh* (Figure 30 C). **Ainsi, durant la première semaine de développement, les plantules de *KO8-2 badh* se développent plus rapidement que les plantules de des trois autres génotypes. Durant les quatre premiers jours, le développement du simple mutant *badh* est intermédiaire. Il est plus rapide que celui de Col-0 et *KO8-2*, mais moins rapide que celui de *KO8-2 badh*.**

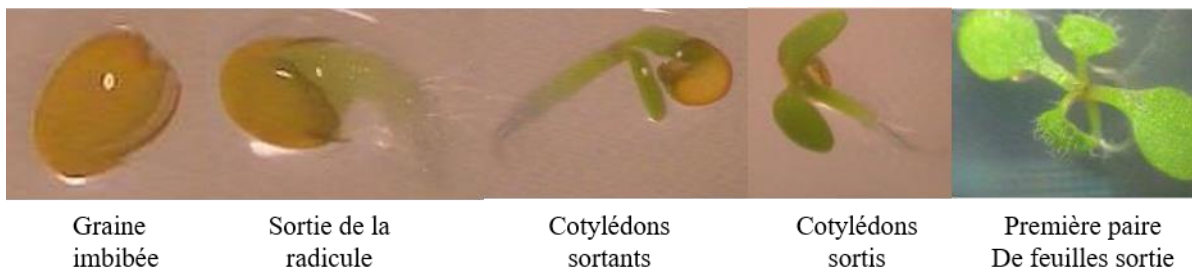
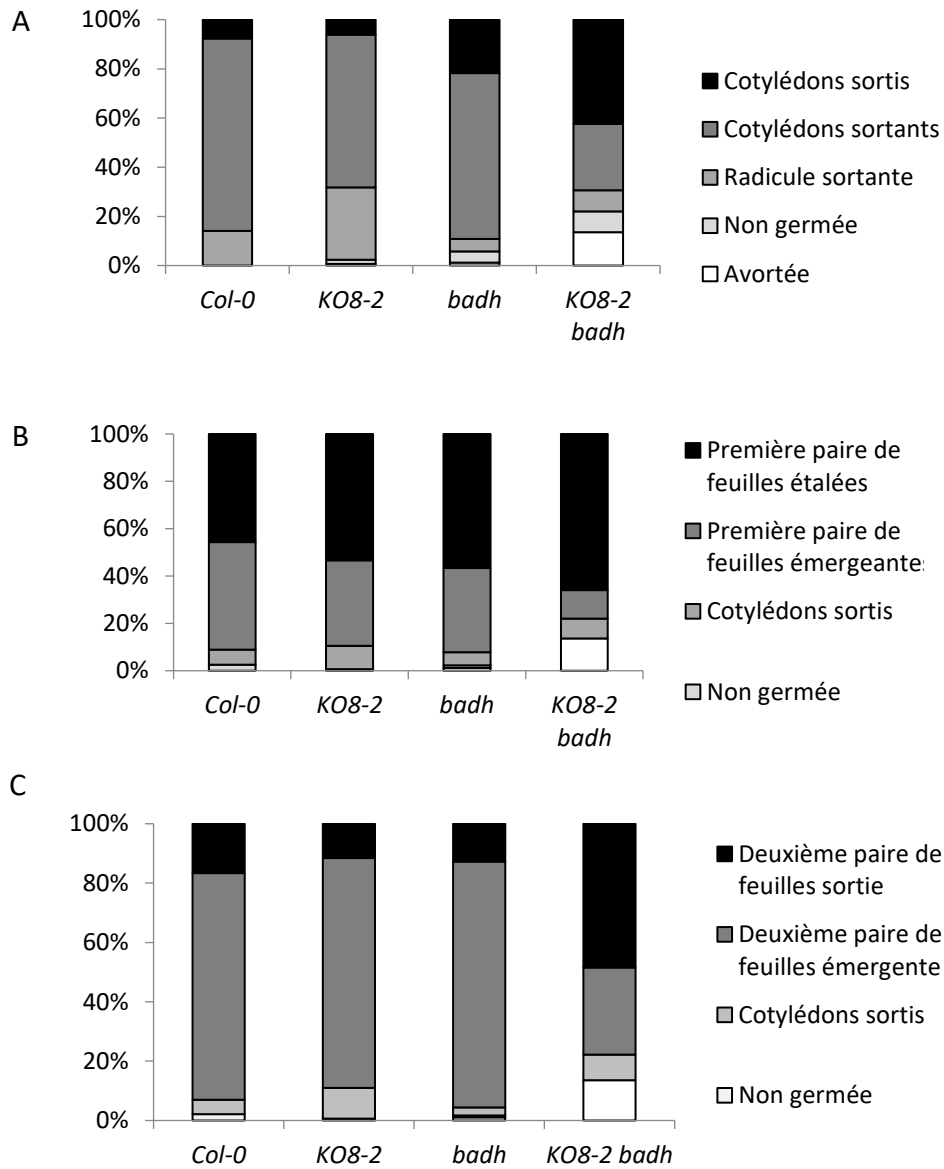


Figure 30 : Développement des plantules au cours de la première semaine chez Col-0, KO8-2, badh et KO8-2 badh (lignées 18, 46 et 49 présentées ensemble) après de 2 jours (A), 4 jours (B) et 7 jours (C) de développement. Les pourcentages de graines ou de plantules à chacun des différents stades de développement précoce sont présentés. En bas : illustrations de quelques stades de développement présentés.

ii. Evolution de la masse de la plantule

L'évolution de la masse fraîche des graines et des plantules âgées de 2, 4 et 7 jours de Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* a été mesurée. Concernant *KO8-2 badh*, les lignées 46 et 49 ont été étudiées et sont présentées ensemble pour les graines, et la lignée 49 seule a été étudiée pour les plantules. La masse de la graine développée est de 22 µg chez Col-0, *KO8-2* et *badh*, et de 41 µg chez *KO8-2 badh*. **La masse de la graine développée de *KO8-2 badh* est donc environ le double de celles de Col-0, *KO8-2* et *badh*.**

De 2 à 7 jours de développement, la masse fraîche d'une plantule de Col-0, *KO8-2* et *badh* passe de 0,2 mg par plantule à 2,2 mg par plantule (Figure 31 A). Elle ne diffère pas significativement entre ces trois génotypes. En revanche, chez *KO8-2 badh*, elle passe de 0,34 à 3,2 mg. **La masse fraîche d'une plantule *KO8-2 badh* est donc significativement supérieure de 30 % à 40 % à celle d'une plantule Col-0 durant toute la première semaine de développement.** La vitesse d'accumulation de masse fraîche a également été quantifiée. Entre 0 et 2 jours de développement, la masse fraîche augmente de 0,08 mg par jour environ chez Col-0, *KO8-2* et *badh*, et de 0,15 mg par jour chez *KO8-2 badh*, soit une cinétique d'augmentation environ deux fois plus élevée chez le double mutant (Figure 31 A). Entre 2 et 4 jours de développement, la masse fraîche augmente de 0,28 mg par jour en moyenne chez Col-0, *KO8-2* et *badh*, et de 0,46 mg par jour chez *KO8-2 badh*, soit une vitesse 40 % plus élevée (Figure 31 A). Entre 4 et 7 jours de développement, la masse fraîche augmente de 0,5 mg par jour en moyenne chez Col-0, *KO8-2* et *badh*, et de 0,64 mg par jour chez *KO8-2 badh*, soit une vitesse 20 % supérieure. Ainsi, durant la première semaine de développement, **la masse fraîche de *KO8-2 badh* augmente plus rapidement que celle de Col-0, *KO8-2* et *badh*.**

L'évolution de la masse sèche durant la première semaine de développement a également été mesurée. Entre 2 et 7 jours de développement, la masse sèche des plantules Col-0, *KO8-2* et *badh* passe de 0,02 à 0,12 mg. Celle de *KO8-2 badh* passe de 0,04 à 0,2 mg (Figure 31 B). **La matière sèche de *KO8-2 badh* est donc significativement supérieure à celle de Col-0, *KO8-2* et *badh*.** De plus, la masse sèche de Col-0, *KO8-2* et *badh* augmente de 0,01 mg par jour entre 2 et 4 jours, puis 0,02 à 0,03 mg par jour entre 4 et 7 jours de développement. La masse sèche de *KO8-2 badh* augmente de 0,02 mg par jour entre 2 et 4 jours, puis 0,04 mg par jour entre 4 et 7 jours (Figure 31 B). **La vitesse d'accumulation de matière sèche est donc deux fois plus élevée chez *KO8-2 badh* par rapport à celle de Col-0, *KO8-2* et *badh*.**

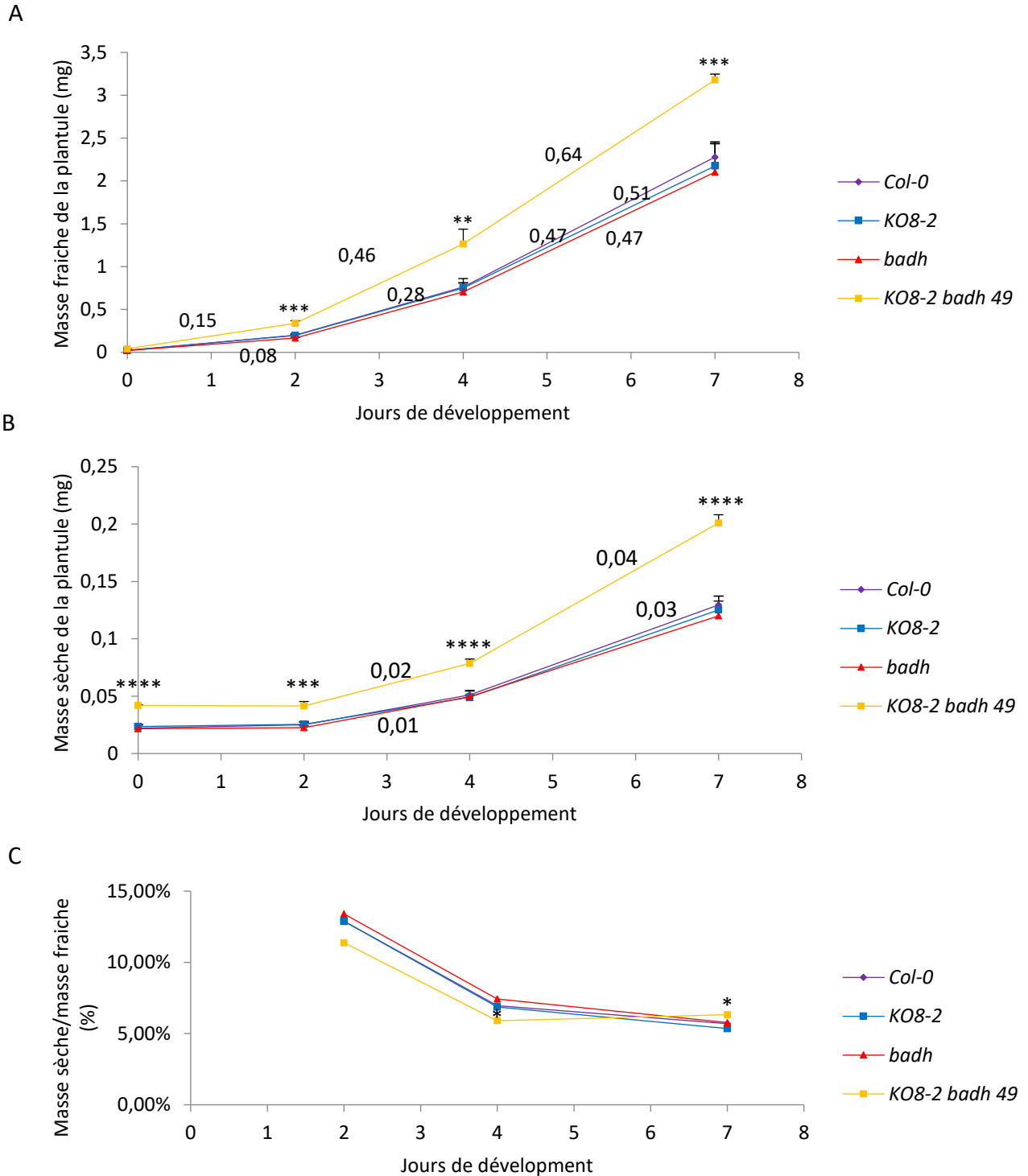


Figure 31 : Variation de la masse fraîche (A), de la masse sèche (B) et du rapport masse sèche/masse fraîche (C) de la plantule à 2 jours, 4 jours et 7 jours après germination chez Col-0, KO8-2, badh et KO8-2 badh 49 (lignée 49). Sur les portions de courbes de la masse sèche sont indiqués les coefficients de variation. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

Durant les deux premiers jours de développement, la teneur en matière sèche de Col-0, *KO8-2* et *badh* varie de 13 % à 7 % de la masse fraîche environ. Celle du double mutant varie de 11,4 % à 5,9 % (Figure 31 C), soit un pourcentage de matière sèche inférieur et donc une teneur en eau supérieure. Dans les plantules âgées de 7 jours, la teneur en matière sèche est de 5,3 % à 5,7 % chez Col-0, *KO8-2* et *badh*, et de 6,3 % chez *KO8-2 badh*. Le pourcentage de matière sèche est significativement supérieur chez *KO8-2 badh*, et la teneur en eau est donc inférieure. **Ainsi, le double mutant *KO8-2 badh* accumule de l'eau plus rapidement que les autres génotypes jusqu'à 4 jours de développement, puis accumule ensuite de la matière sèche plus rapidement.**

e. Analyse des acides gras et des lipides dans les graines et les plantules

i. Dosage des acides gras totaux

Les acides gras totaux ont été extraits et quantifiés par GC-FID dans les graines et les plantules Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* âgées de 2, 4 et 7 jours. Concernant le double mutant, les lignées 18 et 49 ont été analysées. Les résultats de ces deux lignées sont identiques et sont présentés ensemble. La quantité totale d'acides gras est de 10 µg par graine environ chez Col-0, *KO8-2* et *badh*. Elle est de 13,4 µg par graine chez *KO8-2 badh* (Figure 32 A), soit une quantité d'acides gras 34 % supérieure. Cette différence de masse totale est surtout expliquée par une quantité supérieure de C18:2 et de C20:1 (Figure 32 A).

La teneur des acides gras par rapport à la matière sèche dans les graines de Col-0, *KO8-2* et *badh* est de 450 à 519 µg par mg de matière sèche. Elle est de 340 µg par mg de matière sèche chez *KO8-2 badh*, soit une teneur environ 30 % inférieure (Figure 32 B). Tous les acides gras sont affectés de la même manière. **La quantité d'acides gras totaux dans les graines de *KO8-2 badh* est donc significativement supérieure à celle de Col-0, *KO8-2* et *badh*. En revanche, la teneur en acides gras par rapport à la matière sèche est plus faible.** Concernant la composition, une différence significative est observée sur deux acides gras. Le C18:1 représente 21 % des acides gras totaux chez Col-0, *KO8-2* et *badh* et 16 % des acides gras totaux chez *KO8-2 badh*. Le C20:1 représente 20 % des acides gras totaux de Col-0, *KO8-2* et *badh*, contre 23 % de ceux de *KO8-2 badh* (Figure 32 C). En revanche le pourcentage en C18:2 dans les graines est comparable entre les génotypes (26 à 28 %). Ainsi, proportionnellement, **les graines de *KO8-2 badh* sont appauvries en C18:1 et enrichies en C20:1.**

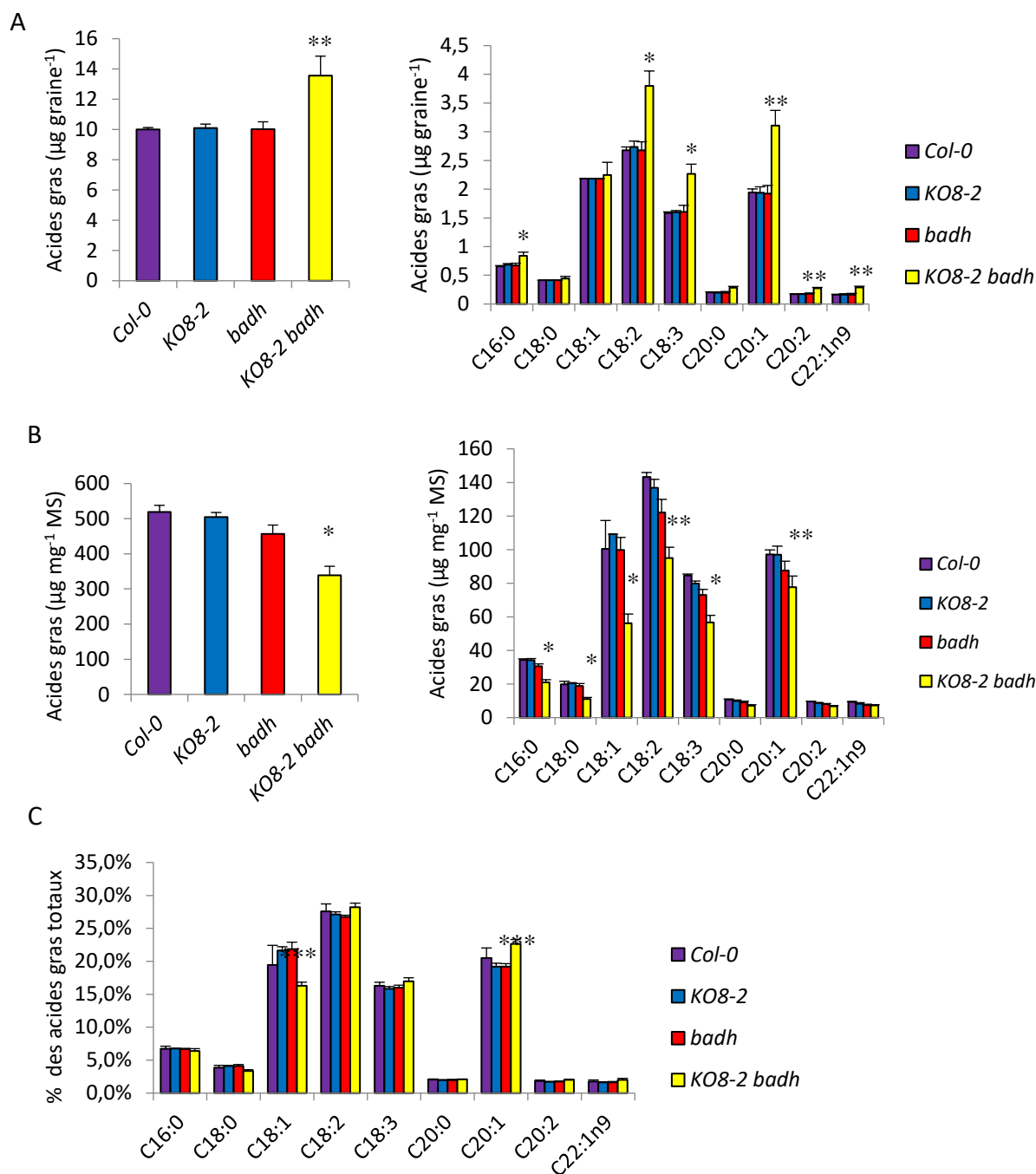


Figure 32 : Quantité d'acides gras totaux par graine mature et quantités des différents acides gras par graine (A), teneur en acides gras par mg de matière sèche (MS) dans les graines et teneurs des différents acides gras (B) et composition en acides gras dans les graines (C), chez Col-0, KO8-2, badh et KO8-2 badh (lignées 18 et 49 présentées ensemble). Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

Les plantules âgées de 2 jours contiennent entre 13 et 15 μg d'acides gras par plantule. Cette teneur ne diffère pas significativement entre les quatre génotypes (Figure 33 A). La teneur en

acides gras dans les plantules est de 530 à 580 μg par mg de matière sèche pour Col-0, *KO8-2* et *badh*. Chez *KO8-2 badh*, elle est de 310 μg par mg de matière sèche (Figure 33 B), soit une teneur significativement inférieure de 40 %. Tous les acides gras affectés de la même manière. La composition en acides gras est identique entre les quatre génotypes. Les acides gras les plus présents sont le C18:2 (25 à 26 %), le C20:1 (20 à 21 %), et le C18:3 (19 à 21 %) (Figure 33 C). Ainsi, **la quantité totale d'acides gras dans les plantules de deux jours est identique entre les 4 génotypes, mais la teneur par rapport à la matière sèche est significativement réduite de 40 % chez *KO8-2 badh*.**

De la même manière, chez les plantules âgées de 4 jours et de 7 jours, la quantité totale d'acides gras par plantule est comparable. En revanche, la teneur en acides gras dans les tissus des plantules est significativement inférieure chez *KO8-2 badh* (Figures 34 et 35). Ainsi, la quantité totale d'acides gras par graine est supérieure chez *KO8-2 badh*. Ensuite, durant la première semaine de développement, **la quantité totale d'acides gras par plantule est identique chez Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh*** (Figure 36 A). En revanche, **la teneur en acides gras par rapport à la matière sèche est réduite de 30 % à 40 % dans les plantules de *KO8-2 badh*** (Figure 36 B).

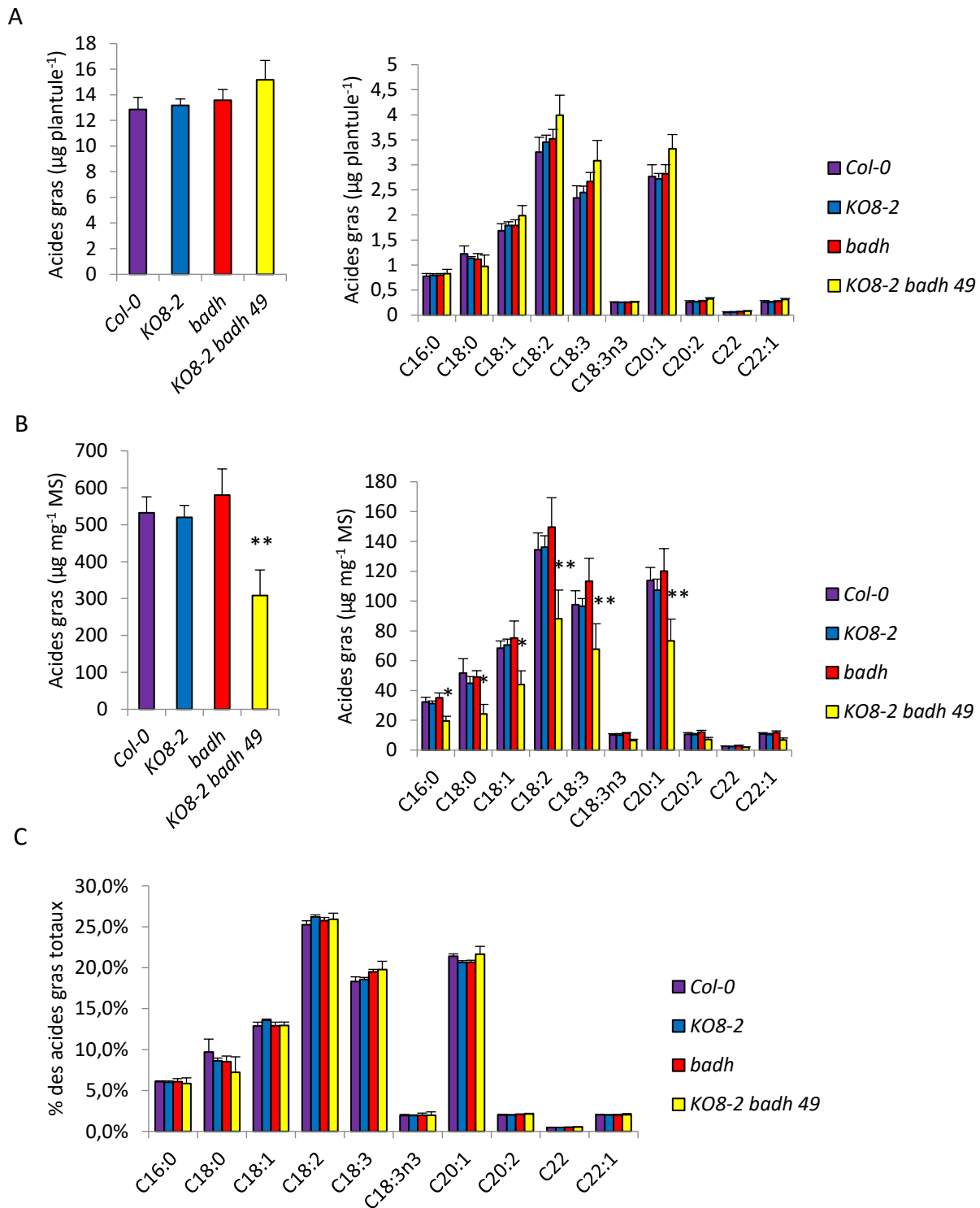


Figure 33 : Quantité d'acides gras totaux par plantule âgée de 2 jours et quantités des différents acides gras par plantule (A), teneur en acides gras par mg de matière sèche (MS) dans les plantules de 2 jours et quantités des différents acides gras (B) et composition en acides gras dans les plantules de 2 jours (C), chez Col-0, KO8-2, badh et KO8-2 badh (lignée 49). Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

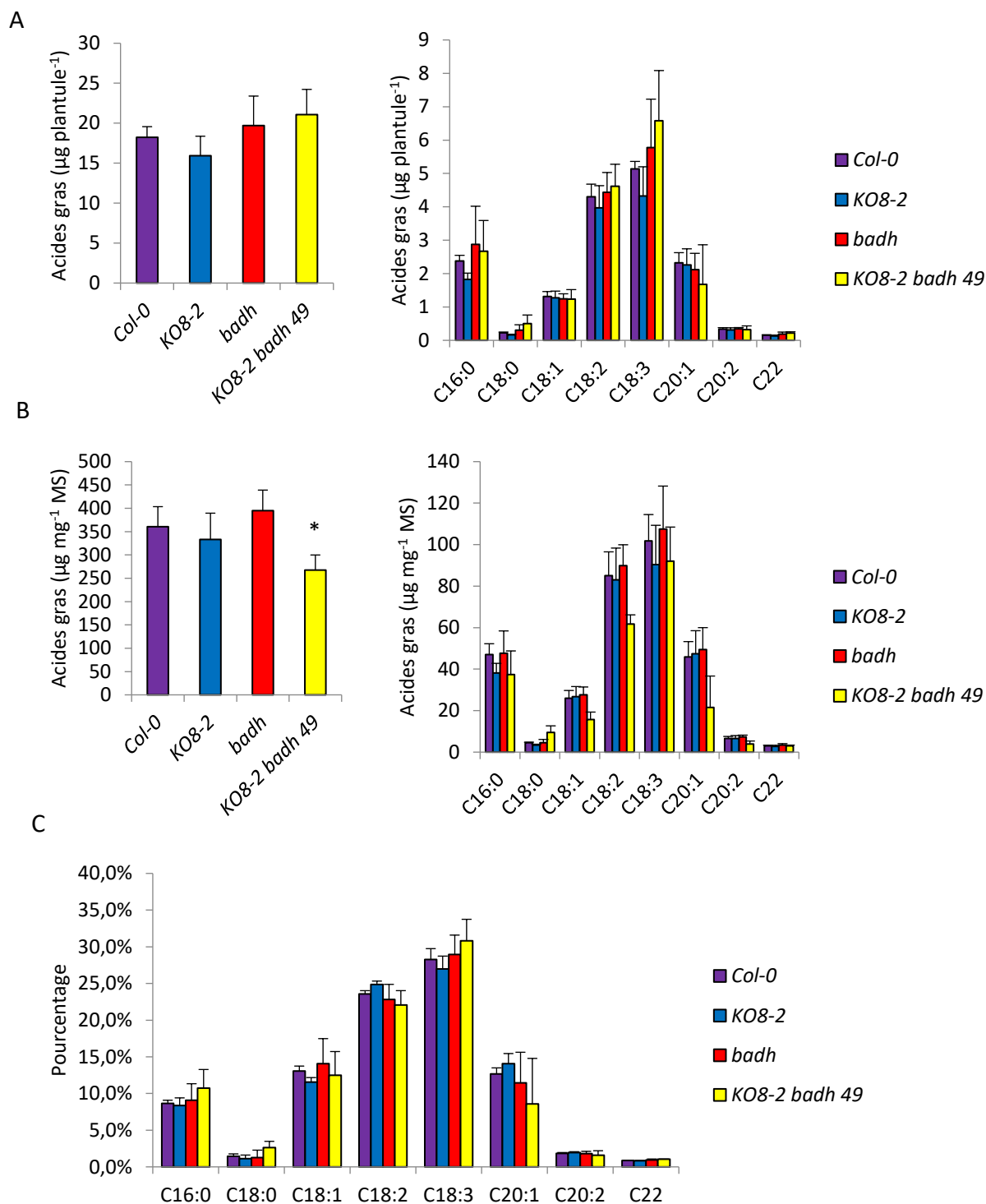


Figure 34 : Quantité d'acides gras totaux par plantule âgée de 4 jours et quantités des différents acides gras par plantule (A), teneur en acides gras par mg de matière sèche (MS) dans les plantules de 4 jours et quantités des différents acides gras (B) et composition en acides gras dans les plantules de 4 jours (C), chez Col-0, KO8-2, badh et KO8-2 badh (lignée 49). Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

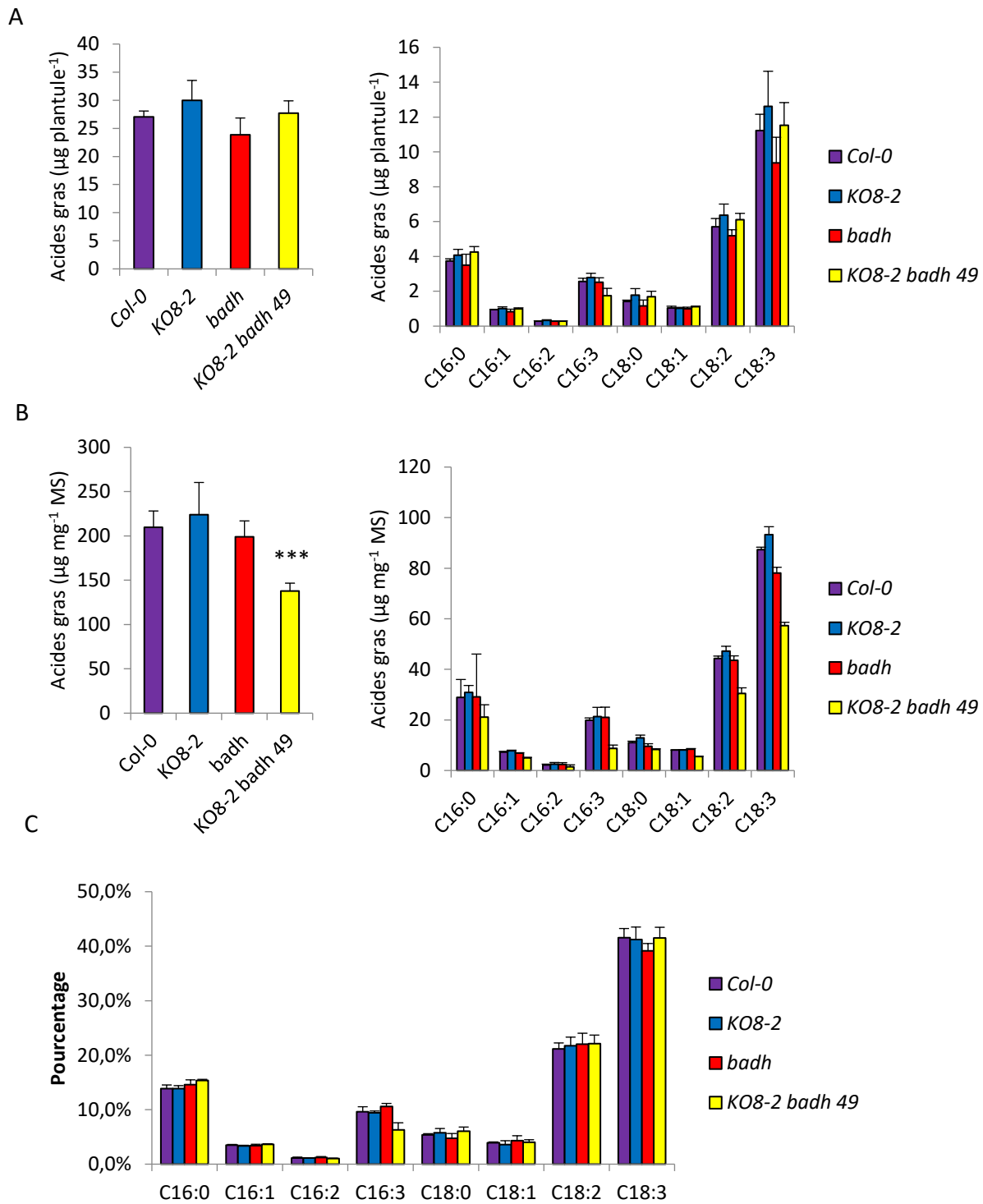


Figure 35 : Quantité d'acides gras totaux par plantule âgée de 7 jours et quantités des différents acides gras par plantule (A), teneur en acides gras par mg de matière sèche (MS) dans les plantules de 7 jours et quantités des différents acides gras (B) et composition en acides gras dans les plantules de 7 jours (C), chez Col-0, KO8-2, badh et KO8-2 badh (lignée 49). Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

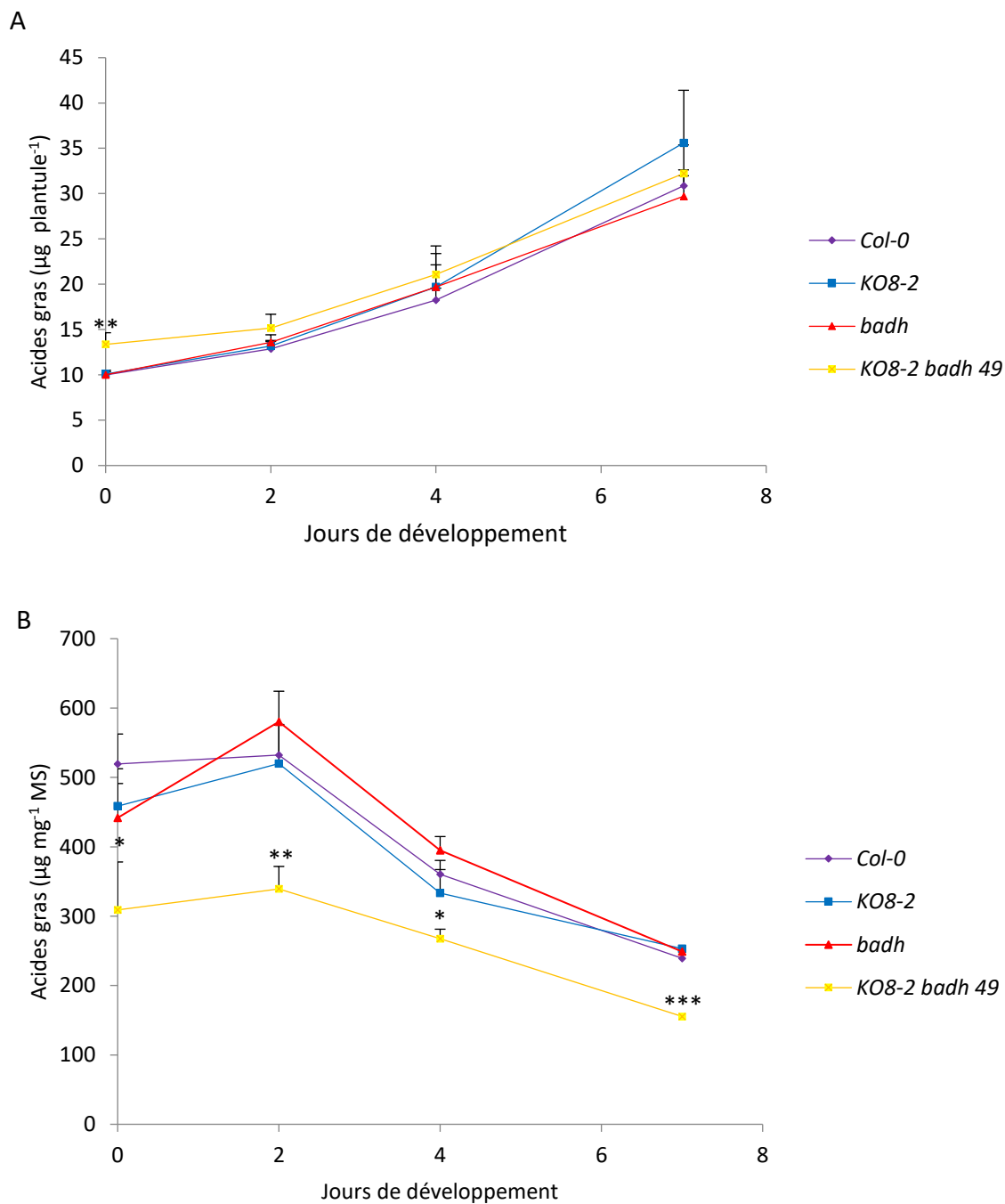


Figure 36 : Variation de la quantité d'acides gras totaux par plantule (A) ou par mg de masse sèche (B) au cours du développement précoce de Col-0, KO8-2, badh et KO8-2 badh. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

ii. Dosage de l'eicosénoate

L'eicosénoate (C20:1), marqueur des TAG, a été dosé au cours du développement des plantules de manière à estimer la vitesse de consommation des lipides de réserve. Les graines et les plantules Col-0, *KO8-2* et *badh* âgées de 2 jours contiennent un stock initial de 2 à 2,7 µg d'eicosénoate par plantule (Figure 37 A et B). Celles de *KO8-2 badh* en contiennent environ 3,2 µg, soit une quantité 60 % supérieure dans les graines et 20 % supérieure dans les plantules. Les graines et les plantules de 2 jours contiennent 100 µg d'eicosénoate par mg de matière sèche environ chez Col-0, *KO8-2* et *badh* et de 77 µg par mg de matière sèche chez *KO8-2 badh* (Figure 37 A et B), soit une teneur réduite de 25 % environ par rapport aux trois autres génotypes. Ainsi, **les graines et les plantules *KO8-2 badh* âgées de 2 jours de contiennent une quantité totale d'eicosénoate dans les graines est 60 % supérieure. Le stock de lipides de réserve dans les graines est donc plus important chez *KO8-2 badh*.** En revanche, la teneur en eicosénoate par rapport à la matière sèche est inférieure aux autres génotypes.

Dans les plantules âgées de 4 et 7 jours, la diminution de la quantité de C20:1 traduit une consommation du stock de lipides de réserve. Les plantules Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* âgées de 4 jours contiennent une quantité comparable d'eicosénoate, soit environ 0,33 µg par plantule (Figure 37 C). Les plantules âgées de 7 jours contiennent 0,19 µg d'eicosénoate par plantule chez Col-0, *KO8-2* et *badh*, et 0,14 µg par plantule chez *KO8-2 badh* (Figure 37 D). La quantité d'eicosénoate est donc significativement réduite de 25 % chez *KO8-2 badh*. Ainsi, **dans les plantules âgées de 4 à 7 jours, le stock d'eicosénoate par plantule devient comparable, puis significativement inférieur chez *KO8-badh* par rapport aux trois autres génotypes.** Tout au long du développement précoce, **la teneur par rapport à la matière sèche est significativement inférieure chez *KO8-2 badh*.**

Le stock d'eicosénoate est essentiellement consommé entre 2 jours et 4 jours à une vitesse moyenne de 1,2 µg par jour chez Col-0, *KO8-2* et *badh*, et 1,5 µg par jour chez *KO8-2 badh* (Figure 38 A). La vitesse de consommation du stock d'eicosénoate est donc supérieure de 25 % chez ce dernier. Ainsi, durant la première semaine de **développement, la quantité totale de lipides de réserves chez *KO8-2 badh* est plus élevée dans les graines et les plantules de 2 jours. Ce stock initial est ensuite consommé plus rapidement durant le développement précoce.** Tout au long du développement précoce, la teneur en eicosénoate par rapport à la matière sèche chez *KO8-2 badh* est inférieure de 40 % à 60 % par rapport à Col-0, *KO8-2* et *badh* (Figure 38 B).

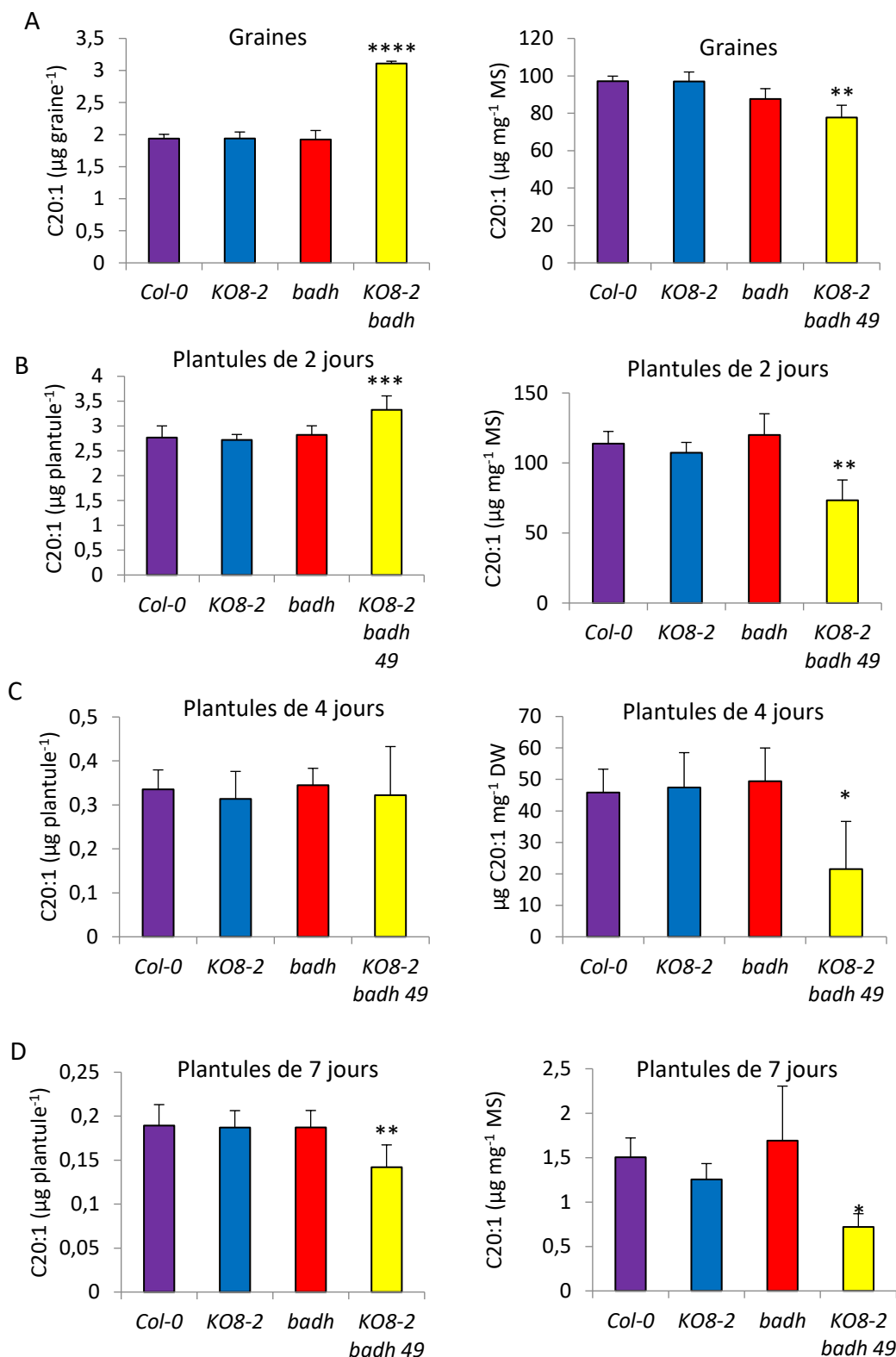


Figure 37 : Quantité d'eicosénoate (C20:1) par graine ou par plantule et teneur en eicosénoate par rapport à la masse de matière sèche dans les graines (A) et les plantules âgées de 2 jours (B), 4 jours (C) et 7 jours (D). Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

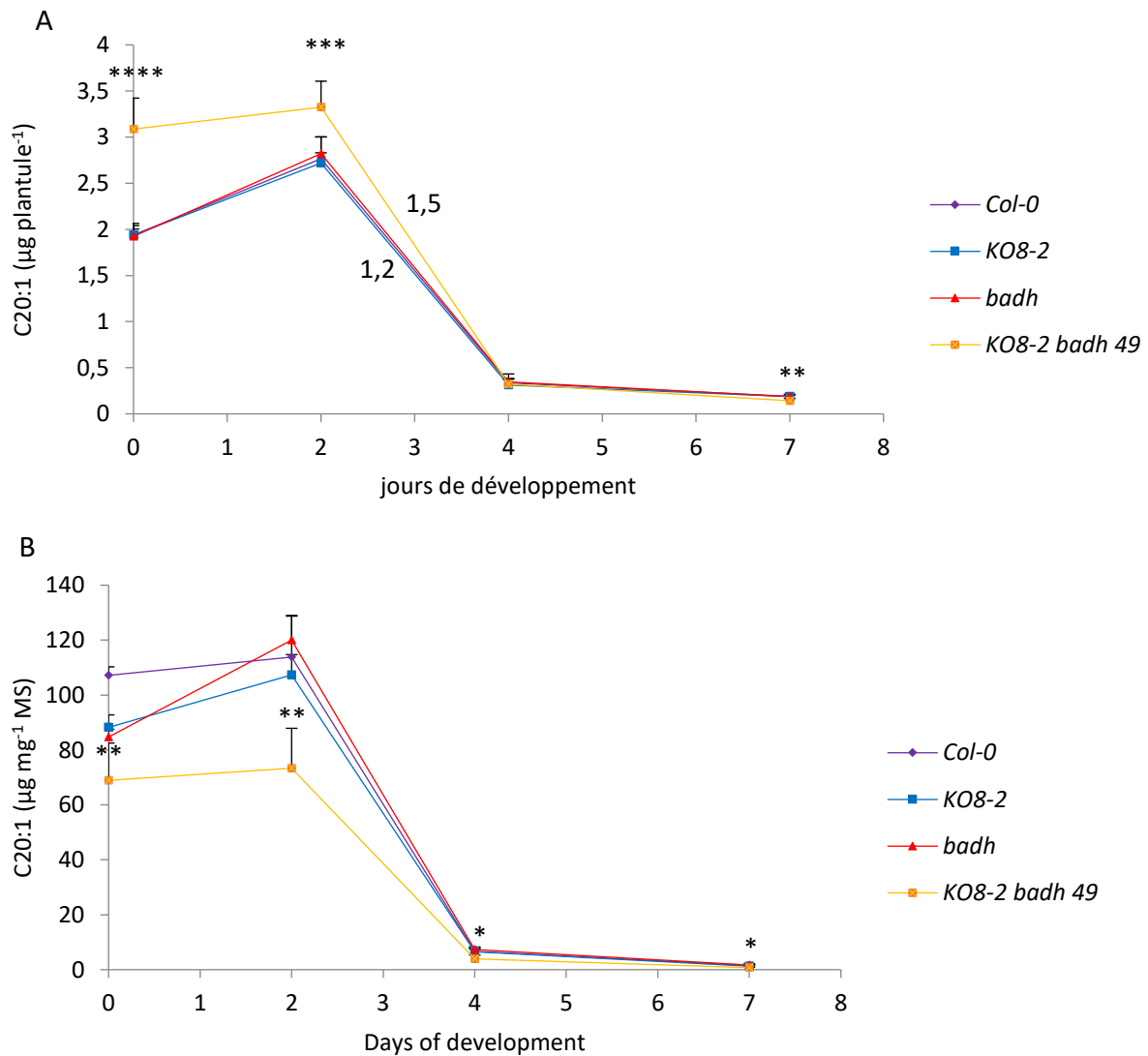


Figure 38 : Evolution de la teneur en eicosénoate par plantule (A) et par mg de matière sèche (B) au cours du développement précoce. Les valeurs de vitesse de consommation de l'eicosénoate entre 2 et 4 jours de développement (en $\mu\text{g jour}^{-1}$) sont indiquées sur la courbe. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

iii. Dosage de l'hexadécatriénoate

L'hexadécatriénoate (C16:3), marqueur des lipides membranaires, a été dosé de manière à estimer sa vitesse de synthèse. Dans les plantules de 2 jours, la quantité totale d'hexadécatriénoate est de 3,6 à 5 ng chez Col-0, KO8-2 et badh, qui ne diffèrent pas significativement entre eux. Elle est de 9 ng chez KO8-2 badh (Figure 39 A), soit environ le double. La teneur en hexadécatriénoate par rapport à la matière sèche est entre 0,16 à 0,18 μg

par mg de matière sèche chez Col-0, *KO8-2* et *badh*. Elle est de 0,22 µg par mg de matière sèche chez *KO8-2 badh* (Figure 39 A), soit une teneur par rapport à la matière sèche significativement supérieure de 37 %. De la même manière, après 4 jours de développement, *KO8-2-badh* comporte également une quantité significativement supérieure (0,1 µg par plantule, contre 0,04 pour les autres génotypes, soit environ le double), et une teneur par rapport à la matière sèche significativement supérieure (Figure 39 B). **Ainsi, chez les jeunes plantules, la quantité d'hexadécatrienoate par plantule et la teneur par rapport à la matière sèche sont significativement supérieures chez *KO8-2 badh*. La synthèse de lipides membranaires chez *KO8-2 badh* est donc plus élevée que chez les trois autres génotypes durant les 4 premiers jours du développement précoce.**

Après 7 jours de développement, les plantules de Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* contiennent entre 1,1 et 1,7 µg d'hexadécatrienoate par plantule (Figure 39 C), et ne diffèrent pas significativement. Les plantules de Col-0, *KO8-2* et *badh* contiennent de 9 à 13 µg d'hexadécatrienoate par mg de matière sèche. Celles de *KO8-2 badh* en contiennent 8 µg par mg de matière sèche. Dans les plantules de 7 jours, la teneur en hexadécatrienoate par rapport à la matière sèche est donc significativement réduite de 24 % chez *KO8-2 badh* par rapport à Col-0 (Figure 39 C). **Ainsi, après 7 jours de développement, la quantité d'hexadécatrienoate par plantule est comparable entre les génotypes, mais chez *KO8-2 badh* la teneur par rapport à la matière sèche devient inférieure à celle de Col-0, *KO8-2* et *badh*** (Figure 39 D).

Ainsi, de manière générale, les plantules de *KO8-2 badh* accumulent une quantité d'hexadécatrienoate plus importante entre 2 et 4 jours de développement, et la différence s'estompe entre 4 et 7 jours de développement (Figure 40 A et B).

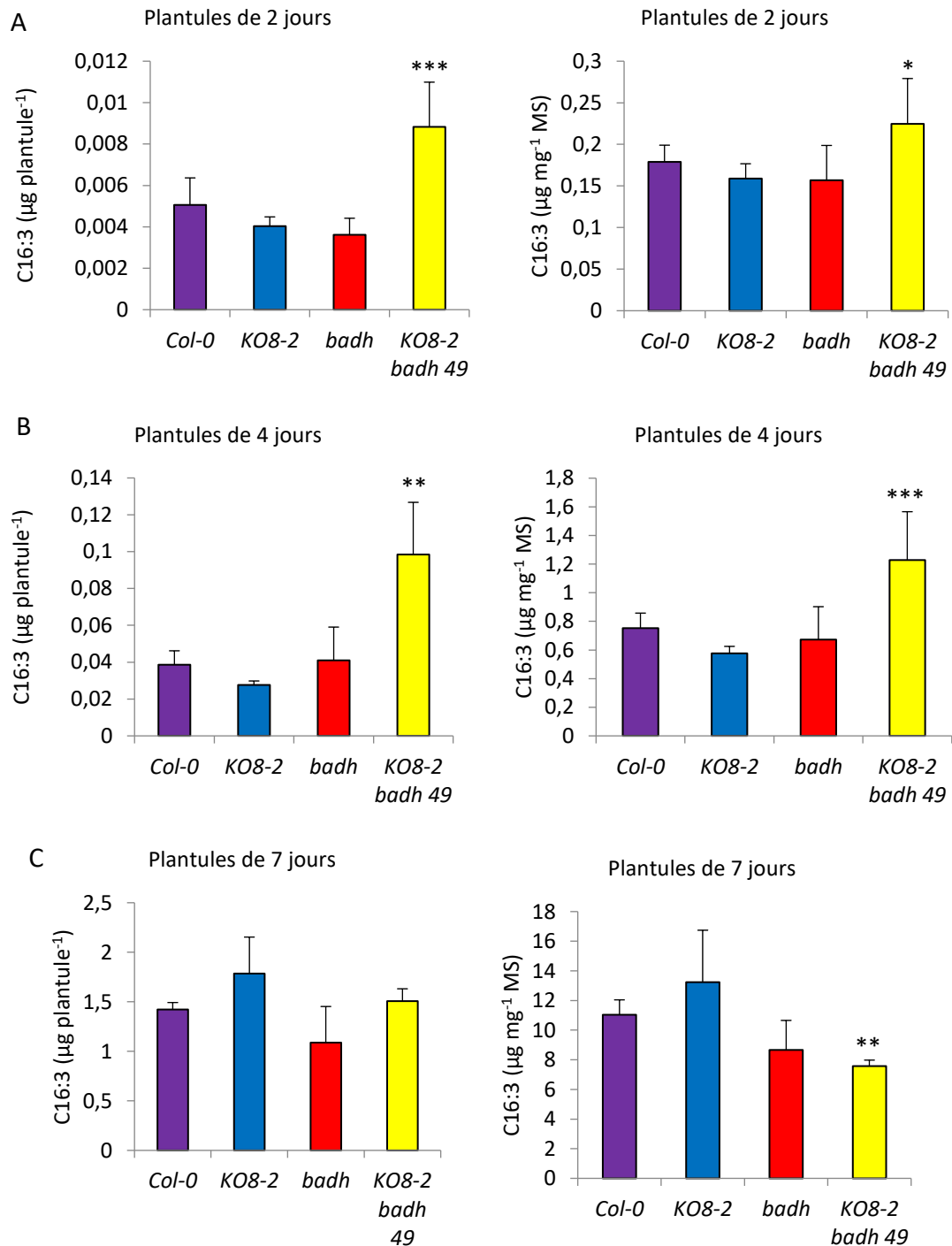


Figure 39 : Quantité d'hexadécatriénoate (C16 :3) par plantule et teneur en hexadécatriénoate par rapport à la matière sèche dans les plantules âgées de 2 jours (A), 4 jours (B) et 7 jours (C). Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

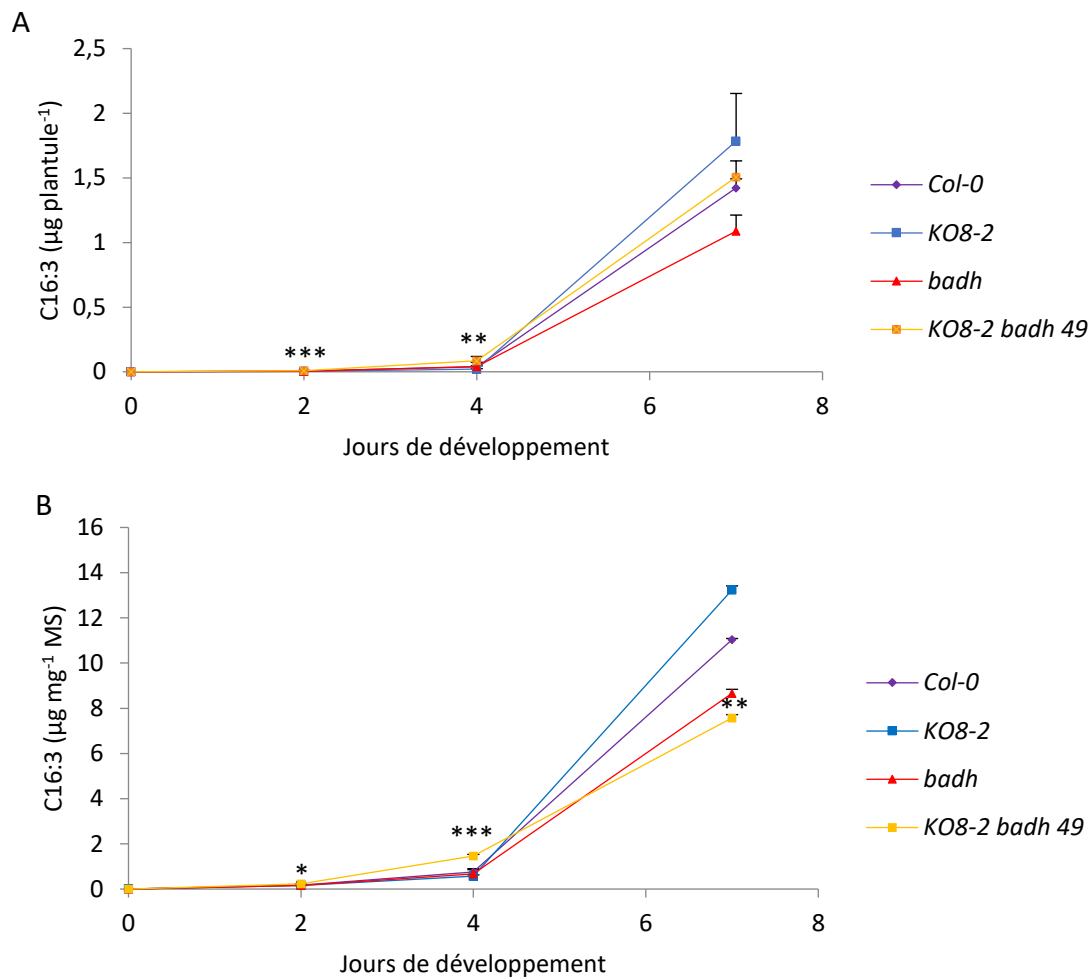


Figure 40 : Evolution de la teneur en hexadécatriénoate par mg de masse sèche (A) et par plantule (B) au cours du développement précoce. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

iv. Analyse des lipides dans les plantules âgées de 4 jours

Les quantifications d'acides gras ont ainsi montré que les plantules de *KO8-2 badh* comportent une teneur réduite en eicosénoate, marqueur de dégradation des TAG, mais sont enrichies en hexadécatriénoate, marqueur de la synthèse de lipides chloroplastique. Pour confirmer et affiner ces résultats, les lipides totaux des plantules âgées de 4 jours ont été extraits et quantifiés par HPLC-QTOF. Cette étude a pour but de vérifier la différence de composition lipidique des plantules chez *KO8-2 badh*, et de confirmer leur enrichissement en lipides membranaires et leur teneur inférieure en TAG.

Les dosages révèlent que les quantités de lipides totaux, de lipides membranaires et de diacylglycérols (DAG) par plantule ne diffèrent pas significativement entre les quatre génotypes. En revanche, la quantité de TAG dans les plantules de *badh* et *KO8-2 badh* est significativement réduite de 60 % (Figure 41 A), en cohérence avec la teneur réduite en eicosénoate.

La composition des lipides totaux varie significativement entre les génotypes. Ainsi, chez Col-0 et *KO8-2*, les TAG représentent respectivement 50 et 44 % (mol/mol) des lipides totaux. Chez *badh* et *KO8-2 badh*, ces proportions sont de 27 % et 26 %, respectivement, soit une réduction de 50 % par rapport à Col-0.

Chez Col-0 et *KO8-2*, 44 et 50 %, respectivement, des lipides totaux sont des lipides membranaires (Figure 41 B). Chez *badh* et *KO8-2 badh*, ces proportions sont de 67 % et 64 %, respectivement, soit une teneur 25 % supérieure environ. La teneur en DAG dans les plantules est elle aussi plus élevée chez *KO8-2 badh* (10 % des lipides totaux) que chez les autres génotypes (5 à 6 % des lipides totaux). Ainsi, comme suggéré par les dosages d'acides gras, **les plantules âgées de 4 jours des mutants *badh* et *KO8-2 badh* sont proportionnellement enrichies en lipides membranaires et appauvries en TAG par rapport à Col-0 et *KO8-2*.**

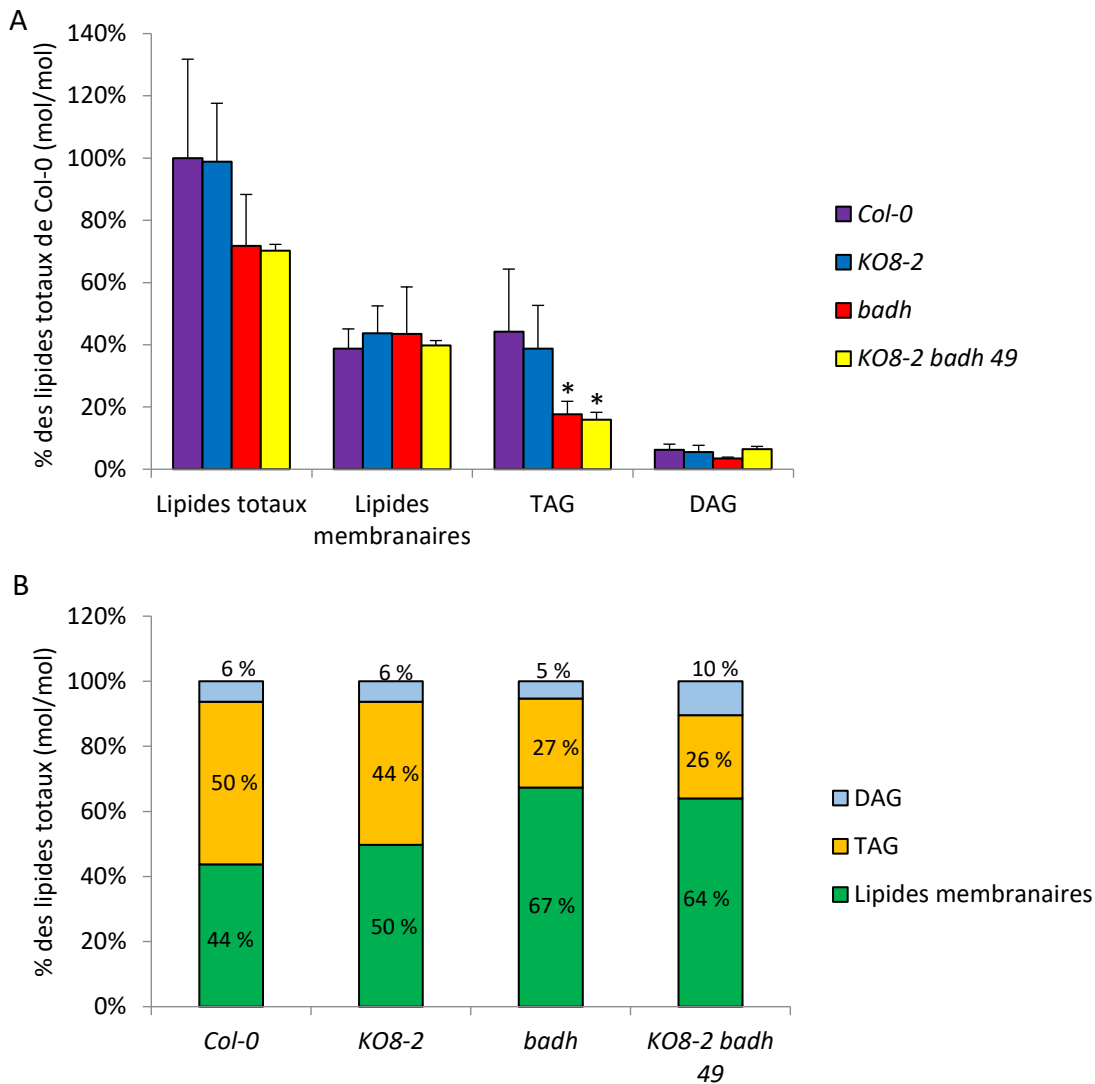


Figure 41 : Quantité totale (A), teneur relative à la masse de matière sèche (B) de lipides totaux, de lipides membranaires, de DAG et de TAG, et composition des lipides totaux (C) dans les plantules âgées de 4 jours de Col-0, KO8-2, badh et KO8-2 badh. Les résultats sont présentés en pourcentages des lipides totaux chez Col-0. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 4 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

En résumé, le double-mutant KO8-2 badh possède des graines matures plus lourdes que Col-0, contenant une réserve en acides gras supérieure. Le développement précoce des plantules de KO8-2 badh est plus rapide, et une accumulation plus rapide de matière sèche, accompagnée d'une consommation accrue des lipides de réserve et d'une synthèse plus rapide de lipides membranaires jusqu'à 4 jours de développement (Tableau 14).

Tableau 14 : Principales caractéristiques du double mutant *KO8-2 badh* par rapport à Col-0 concernant le développement précoce.

	Phénotype de <i>KO8-2 badh</i>
Masse de la graine	86 % supérieure
Réserves d'acides gras dans les graines	34 % supérieure
Réserve d'eicosénoate dans les graines	60 % supérieure
Développement précoce	Emergence plus rapide des cotylédons et des deux premières paires de feuilles
Masse de la plantule durant la première semaine de développement	30 % à 40 % supérieure
Consommation des lipides de réserves	25 % plus rapide
Vitesse d'accumulation de masse sèche	100 % plus rapide
Synthèse de lipides membranaires	100 % plus élevée à 2 et 4 jours
Quantité de lipides dans les plantules	Comparable
Composition lipidique des plantules de 4 jours	Proportionnellement enrichies en lipides membranaires et appauvries en TAG

Les graines et les plantules du double mutant *KO8-2 badh* sont significativement plus lourdes et accumulent plus de matière sèche que celles de Col-0. Cette masse sèche plus élevée n'est pas expliquée par une quantité plus élevée de lipides dans les plantules. L'évolution de la masse de protéines et d'amidon dans les graines et les plantules a été donc étudiée, afin de d'expliquer la différence de masse sèche entre *KO8-2 badh* et les autres génotypes.

a. Dosage de l'amidon dans les graines et les plantules

La quantité d'amidon a été dosée dans les graines et les plantules Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh*. Dans les graines et les plantules d'*Arabidopsis*, la teneur en amidon est très faible en comparaison des lipides et des protéines. Les quatre génotypes contiennent de 0,59 à 0,7 µg d'amidon par graine, sans différence significative (Figure 42 A). Ici encore, en raison de leur masse inférieure, les graines de Col-0, *KO8-2* et *badh* contiennent de 27 à 30 µg d'amidon par mg de matière sèche tandis que celles de *KO8-2 badh* contiennent 16,8 µg par mg de matière sèche, soit une réduction de 44 %.

Entre 2 et 7 jours de développement, la quantité d'amidon varie de 0,8 à 1,42 µg par plantule chez Col-0 et *KO8-2*. Chez *badh*, elle varie de 0,8 à 1,65 µg par plantule, mais la différence

n'est pas significative. Chez *KO8-2 badh*, la quantité d'amidon varie de 0,88 μg à 1,68 μg par graine (Figure 42 A), elle est donc significativement supérieure de 15 % environ aux autres génotypes. Ainsi, la quantité d'amidon dans les graines est comparable. Mais de 2 à 7 jours de développement, la quantité totale d'amidon par plantule de *KO8-2 badh* est significativement supérieure à celle de *Col-0* et de *KO8-2*.

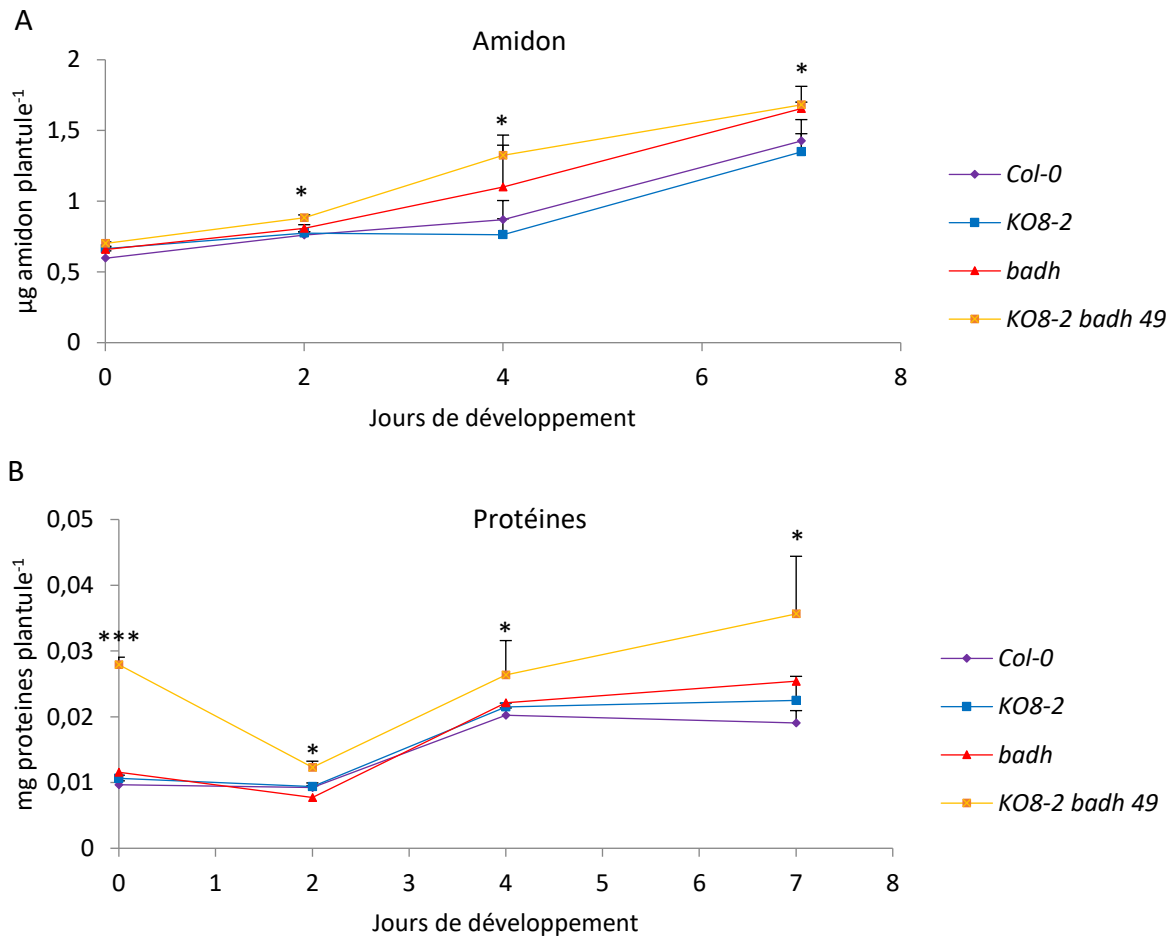


Figure 42 : Variation de la quantité d'amidon (A) et de protéine (B) par plantule au cours du développement précoce d'Arabidopsis. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et *Col-0* en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

Ici encore, en raison de la masse supérieure des plantules de *KO8-2 badh*, la teneur en amidon par rapport à la matière sèche dans les plantules est inférieure chez le double mutant, variant de 21,3 à 8,4 μg par mg de matière sèche contre 30 à 11 μg par mg de matière sèche environ chez *Col-0* et *KO8-2 badh*, soit une teneur réduite de 20 à 30 %.

b. Dosage des protéines dans les graines et les plantules

Les protéines solubles dans les graines et les plantules âgées de 2, 4 et 7 jours ont été extraites et quantifiées par dosage de Bradford (Bradford 1976). Col-0, *KO8-2* et *badh* contiennent 9,6 à 11,5 µg de protéines solubles par graine. Cette quantité ne diffère pas significativement entre ces trois génotypes. Le double mutant *KO8-2 badh* contient en moyenne 27,9 µg de protéines par graine (Figure 42 B). **La quantité de protéines solubles par graine est donc 2,8 fois supérieure chez *KO8-2 badh*.** De 2 à 7 jours de développement, **la teneur en protéines solubles par mg de matière sèche est supérieure de 30 à 42 % chez *KO8-2 badh*,** variant de 0,012 à 0,035 mg par plantule, contre 0,009 à 0,02 environ pour Col-0, *KO8-2* et *badh*.

c. Variation de la composition de la matière sèche au cours du développement précoce

Les différences de teneurs en acides gras, en amidon et en protéines solubles entre *KO8-2 badh* et les autres génotypes expliquent en partie seulement la différence de masse sèche des plantules. Pour mieux comprendre les différences de masse sèche entre les génotypes, les quantités d'acides gras, d'amidon et de protéines solubles à chaque stade de développement sont présentées par rapport à la masse sèche totale (Figure 43). La différence entre la somme des trois et la masse sèche totale de la graine et de la plantule correspond à des molécules qui n'ont pas été dosées (notées autres composés). Ces composés incluent vraisemblablement des molécules variées telles que la cellulose, les protéines non solubles ou encore les acides nucléiques, notamment.

Cette représentation met en évidence le fait que la différence de masse des graines est essentiellement expliquée par les protéines, qui représentent 60 % de la masse de la graine chez *KO8-2 badh* contre 50 % chez les autres génotypes (Figure 43 A). En revanche, chez les plantules âgées de 2 à 7 jours, la différence de masse sèche est essentiellement expliquée par l'accumulation plus rapide de ces autres composés dans la plantule chez *KO8-2 badh* par rapport aux autres génotypes. Ils représentent 30 % de la masse de la plantule à 2 et 4 jours, contre 10 à 20 % chez Col-0, *KO8-2* et *badh* (Figure 43 B et C). La différence s'estompe à 7 jours de développement. A ce stade, les autres composés représentent 65 % de la masse de matière sèche chez *KO8-2 badh*, et environ 60 % de la masse sèche chez les autres génotypes (Figure 43 D). **Ainsi, l'accumulation de ces autres composés a lieu plus tôt chez *KO8-2 badh* que chez les autres génotypes.**

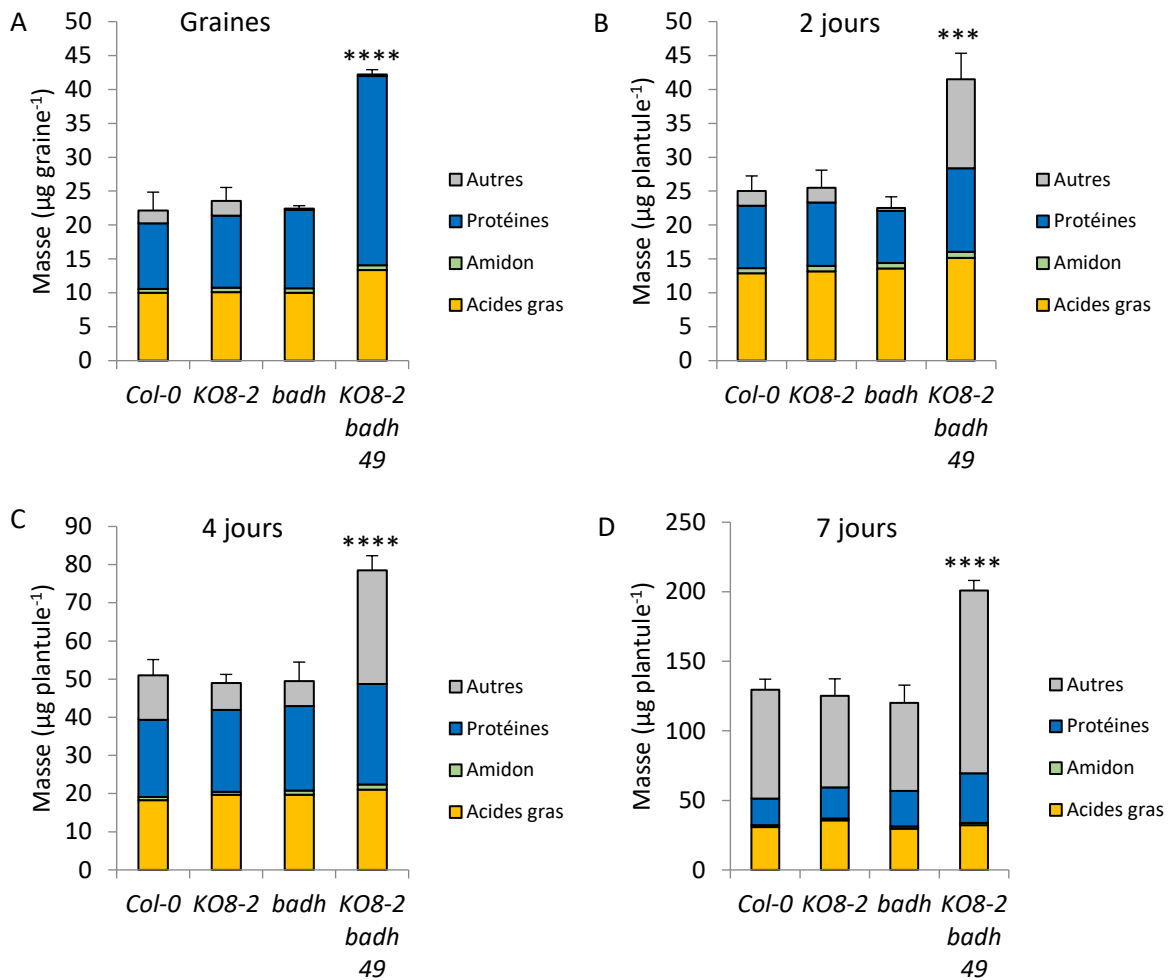


Figure 43 : Evolution de la masse d'acides gras, amidon, protéines et autres composés dans les graines et les plantules âgées de 2, 4 et 7 jours. La somme des masses des composés représente la masse sèche de la plantule. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 pour la masse sèche totale, en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

Ainsi, le double mutant *KO8-2 badh* contient dans ses graines une quantité d'amidon comparable, et une quantité de protéines et d'acides gras significativement plus élevée (Tableau 15). Les plantules contiennent une quantité d'amidon et de protéines significativement supérieures, mais la quantité d'acides gras est comparable.

Tableau 15 : Principales caractéristiques du double mutant *KO8-2 badh* par rapport à Col-0 concernant la teneur en amidon et protéines dans les graines et les plantules.

	Phénotype de <i>KO8-2 badh</i>
Quantité de protéines dans les graines	280 % supérieure
Quantité d'amidon dans les graines	Comparable
Quantité d'acides gras dans les graines	34 % supérieure
Quantité de protéines dans les plantules âgées de 2 à 7 jours	30 à 40 % supérieure
Quantité d'amidon dans les plantules	15 % supérieure
Quantité d'autres composés dans les plantules	2 à 7 fois supérieure

d. Mesure de l'activité des enzymes AtALDH10 dans les extraits protéiques

Les AtALDH10 étant capables d'oxyder efficacement l'ABAL et le TMABAL (Chapitre A), l'impact de la perte de fonction pour ces enzymes sur la capacité de la plante à oxyder ces substrats a été analysé *in vitro*. Les protéines solubles totales des plantules de Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* (lignée 49) âgées de 4 jours ont été extraites, et l'oxydation de l'ABAL et du TMABAL par les extraits protéiques a été mesurée. Chez *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh*, l'oxydation de l'ABAL par les extraits protéiques est de réduite de 25 %, 20 % et 33 %, respectivement, par rapport à celle de l'extrait protéique de Col-0, (Figure 44 A). **Ainsi, la capacité d'oxydation de l'ABAL est significativement réduite chez les trois mutants, *KO8-2 badh* étant le mutant le plus affecté.**

L'oxydation du TMABAL par les extraits protéiques de *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* est réduite de 70 %, 56 % et 86 %, respectivement, par rapport à celle de l'extrait protéique de Col-0 (Figure 44 B). **Ainsi, la capacité d'oxydation du TMABAL est significativement réduite chez les trois mutants, *KO8-2 badh* étant, là encore, le mutant le plus affecté. Une activité résiduelle d'oxydation de l'ABAL et du TMABAL subsiste chez *KO8-2 badh*. L'activité résiduelle avec le TMABAL est 5 fois plus faible par rapport à Col-0 que l'activité résiduelle avec l'ABAL.**

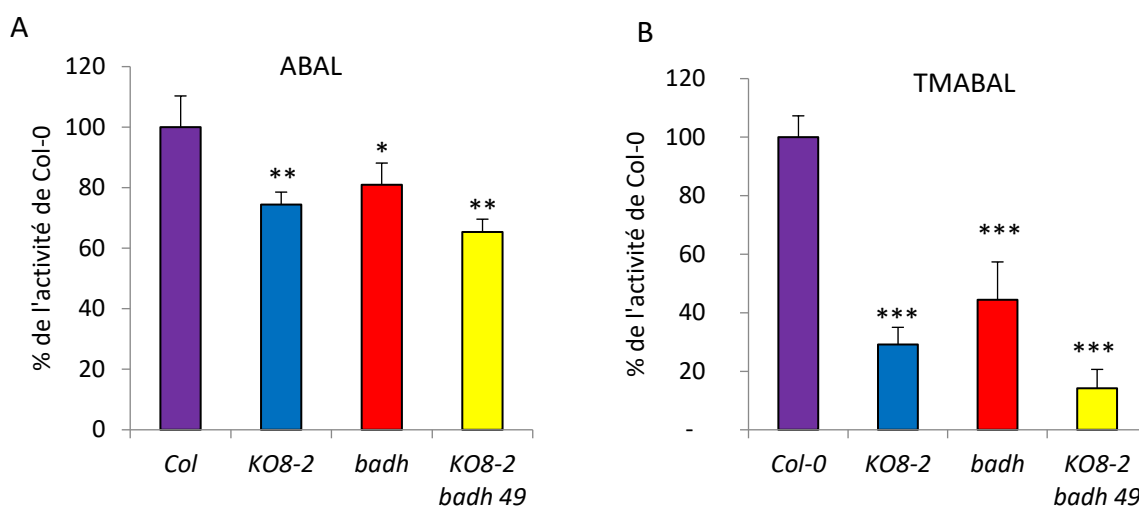


Figure 44 : Activité des extraits protéiques de plantules de Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* âgées de 7 jours sur deux substrats des AtALDH10 : l'ABAL (A) et le TMABAL (B). Les activités sont exprimées en pourcentage du sauvage. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

e. Dosage du GABA, de la γ -butyrobétaine et de la carnitine

La capacité réduite des mutants *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* à oxyder l'ABAL et le TMABAL suggère que la synthèse de GABA et de γ -butyrobétaine pourrait être affectée chez ces mutants. La γ -butyrobétaine étant un précurseur possible de la carnitine chez les plantes (Rippa *et al.* 2012), la capacité des mutants à synthétiser la carnitine pourrait être elle aussi affectée. Le GABA, la γ -butyrobétaine et la carnitine ont donc été quantifiés par LC-ESI-MS/MS dans les plantules âgées de 11 jours, et dans les feuilles caulinaires de plantes âgées de 5 semaines, chez les quatre génotypes.

Le GABA et la carnitine sont deux molécules pouvant intervenir dans la résistance au stress salin chez les plantes (Shelp *et al.* 1999; Kinnersley and Turano 2000; Charrier *et al.* 2012). Or le double mutant *KO8-2 badh* montre une sensibilité accrue au stress salin. Il pourrait donc être affecté dans la production d'osmolytes en réponse au stress salin. Pour vérifier cette hypothèse, les teneurs en GABA, γ -butyrobétaine et carnitine ont donc aussi été mesurées dans les plantules ayant été cultivées en conditions de stress salin. Dans un premier temps, les plantules ont été cultivées durant 7 jours sur milieu Murashige & Skoog avec agar, et dans un deuxième temps durant 4 jours sur le même milieu contenant 50 mM NaCl. Le GABA, la γ -butyrobétaine

et la carnitine ont également été dosés les feuilles de plantes âgées de 5 semaines ayant subi durant une semaine un arrosage avec 150 mM de NaCl.

i. Dosage du GABA

La teneur en GABA dans les plantules de Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* varie de 0,35 à 0,48 ng par mg de matière sèche (Figure 45 A), et ne diffère pas significativement. Dans les feuilles caulinaires de Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh*, la teneur en GABA dans les feuilles est de l'ordre de 0,93 à 1,22 ng par mg de matière sèche, et ne diffère pas non plus significativement (Figure 45 B). Ainsi, **la teneur en GABA dans les plantules et dans les feuilles caulinaires est comparable entre les quatre génotypes.**

Dans les plantules cultivées en conditions de stress salin, la teneur en GABA est comparable à celle des plantes cultivées en conditions normales. Celle de Col-0 est de 0,30 ng par mg de matière sèche. Celle des mutants *KO8-2* et *badh* est de 0,22 ng par mg de matière sèche, et celle de *KO8-2 badh* est de 0,16 ng par mg de matière sèche (Figure 45 C). Les différences entre les génotypes ne sont pas significatives.

Les feuilles caulinaires de Col-0 ayant subi un stress salin comportent en moyenne 30 µg de GABA par mg de matière sèche, soit une teneur 30 fois supérieure à celle des feuilles de Col-0 cultivées en conditions normales. Celles de *KO8-2* en contiennent 25 µg par mg de matière sèche, soit une teneur 25 fois supérieure à celle des feuilles cultivées en conditions normales. *badh* et *KO8-2 badh* en comportent 15 µg par mg de matière sèche (Figure 45 D), soit une teneur 15 fois supérieure à celle des feuilles cultivées en conditions normales. Bien que les résultats obtenus ici suggèrent une tendance de *badh* et *KO8-2 badh* à accumuler moins de GABA que Col-0 et *KO8-2*, les différences ne sont pas significatives.

Ainsi, dans nos conditions de culture, **le stress salin entraîne une accumulation du GABA dans les feuilles caulinaires, mais pas dans les plantules. La capacité des quatre génotypes à accumuler le GABA dans les feuilles en réponse au stress est comparable.**

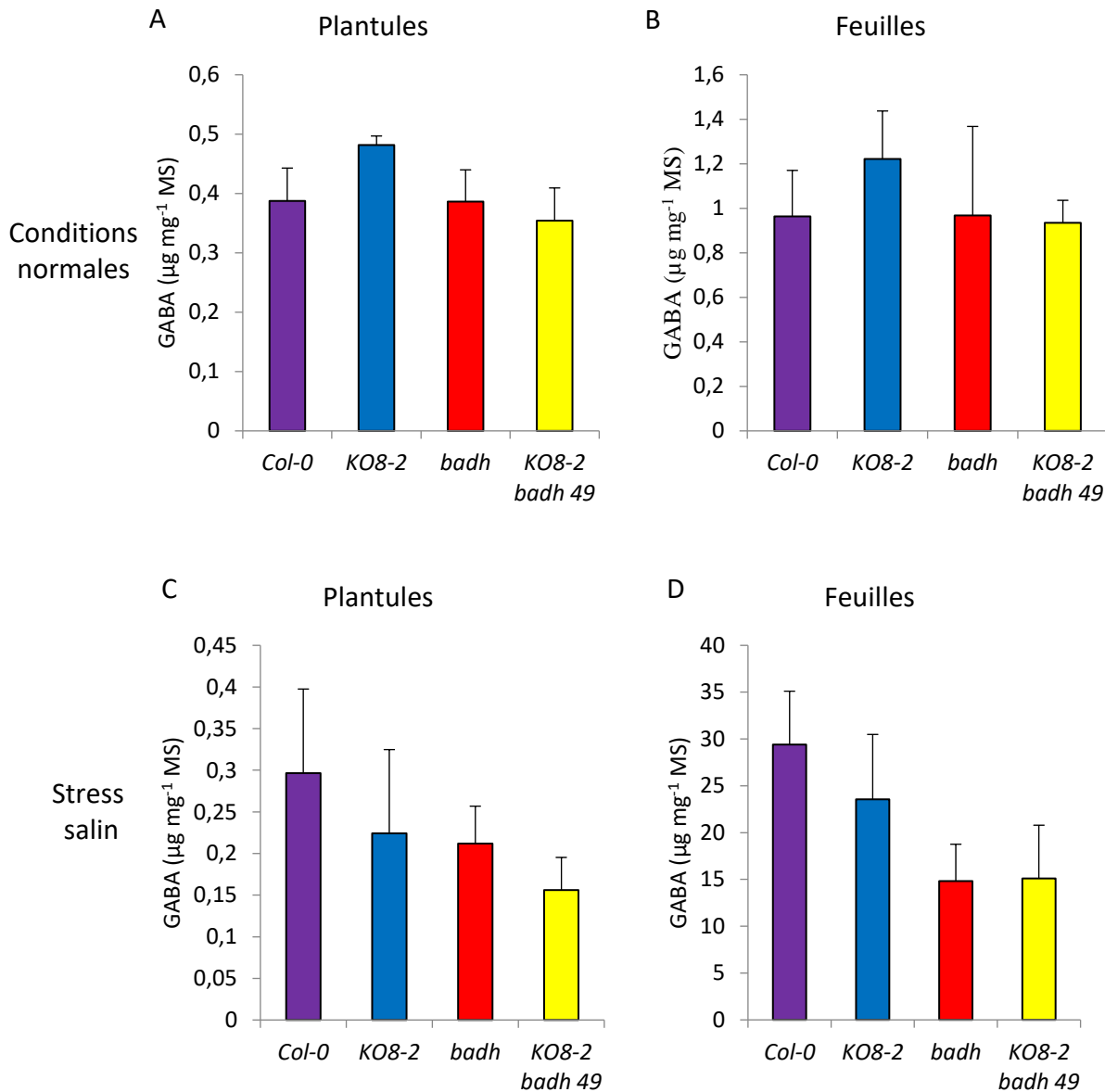


Figure 45 : Teneur en GABA dans les plantules de 11 jours (A) et les feuilles caulinaires de plantes âgées de 5 semaines (B) de Col-0 et des mutants *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* (lignée 49) cultivées en conditions normales. Teneur en GABA dans les plantules de 11 jours (C) et les feuilles caulinaires de plantes âgées de 5 semaines (D) de Col-0 et des mutants *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* (lignée 49) cultivées en conditions de stress salin. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

ii. Dosage de la γ -butyrobétaine

Au contraire, concernant la teneur en γ -butyrobétaine, des teneurs différentes entre les génotypes ont été mesurées. Dans les plantules de 11 jours, la teneur en γ -butyrobétaine est de 31 ng par mg de matière sèche chez Col-0. Celle des mutants *KO8-2* et *badh* est de 23,5 et 24,2

ng par mg de matière sèche en moyenne (Figure 46 A), mais ne diffère pas significativement par rapport à Col-0. La teneur en γ -butyrobétaïne dans les plantules de *KO8-2 badh* est de 8,7 ng par mg de matière sèche, soit une réduction très importante de 73 % par rapport à la teneur de Col-0 en conditions normales.

Concernant les feuilles caulinaires, Col-0 contient 4,35 ng de γ -butyrobétaïne par mg de matière sèche. Les simples mutants *KO8-2* et *badh* contiennent en moyenne 2,00 ng de γ -butyrobétaïne par mg de matière sèche (Figure 46 B), soit une réduction de 55 % par rapport à Col-0. *KO8-2 badh* contient 0,56 ng de γ -butyrobétaïne par mg de matière sèche, soit une réduction de 87 % par rapport à Col-0 et de 75 % par rapport à *KO8-2* et *badh*. La teneur en γ -butyrobétaïne est plus importante dans les plantules que dans les feuilles caulinaires, d'un facteur 10 environ.

Ainsi, dans les plantules comme dans les feuilles caulinaires, la teneur en γ -butyrobétaïne est significativement réduite chez *KO8-2 badh* par rapport à Col-0, *KO8-2* et *badh*. Chez les simples mutants *KO8-2* et *badh*, la teneur en γ -butyrobétaïne est significativement réduite par rapport à Col-0 dans les feuilles caulinaires, mais pas dans les plantules.

Dans les plantules cultivées en conditions de stress salin, la teneur en γ -butyrobétaïne est de 8,2 ng par mg de matière sèche chez Col-0. Celle des mutants *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* est de respectivement 5,1 ; 4,8 et 3,5 ng par mg de matière sèche (Figure 46 C). **La teneur en γ -butyrobétaïne est donc inférieure à celle des plantes cultivées en conditions normales. Elle est plus importante dans les plantules que dans les feuilles caulinaires, quelles que soient les conditions.** Elle est divisée par 4 chez Col-0 et par 2 chez *KO8-2 badh*. Les différences entre les génotypes ne sont pas significatives.

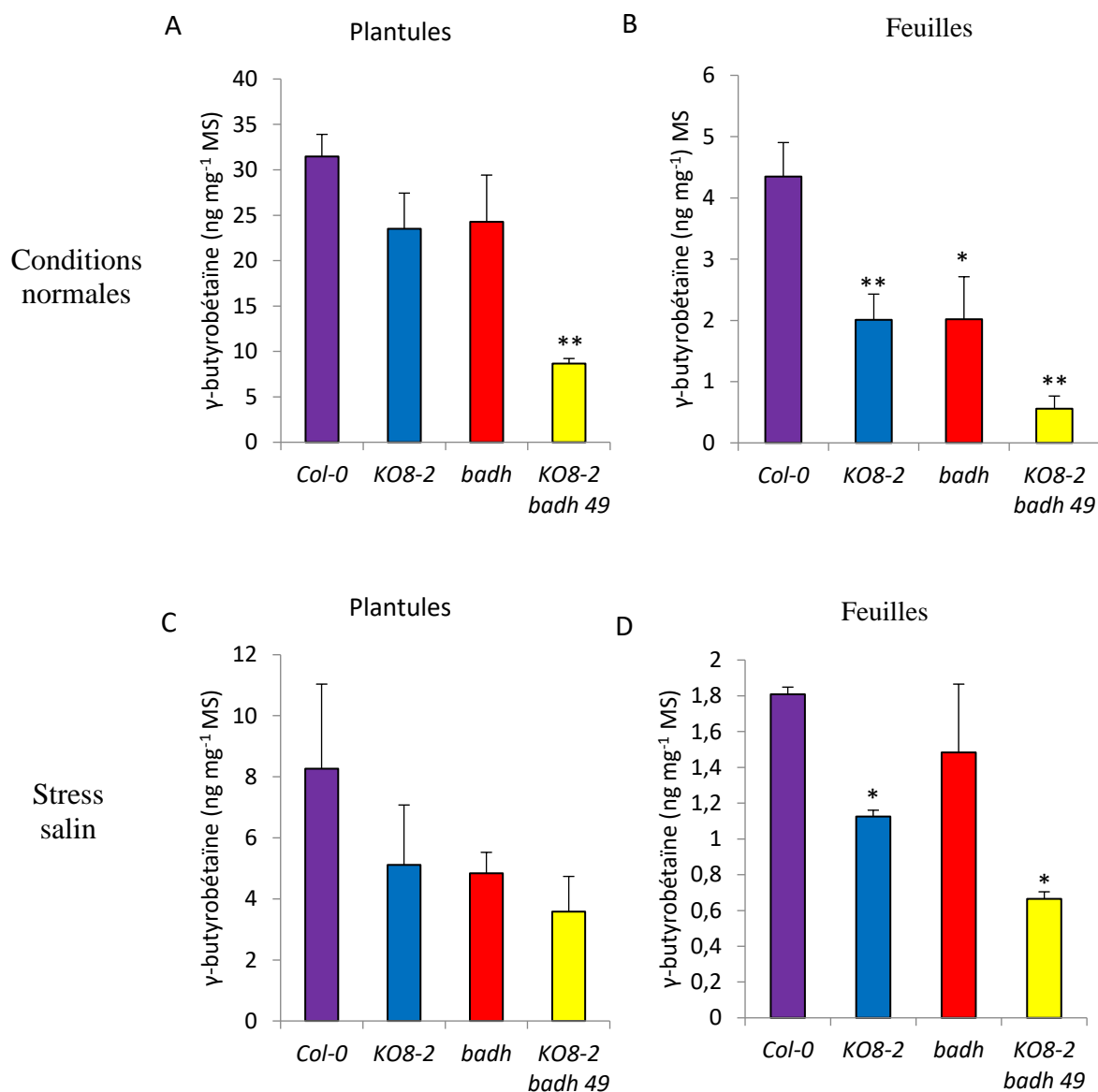


Figure 46 : Teneur en γ -butyrobétaine dans les plantules âgées de 11 jours (A) et dans les feuilles caulinaires de plantes âgées de 5 semaines (B) de Col-0 et des mutants *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* (lignée 49) cultivées en conditions normales. Teneur en γ -butyrobétaine dans les plantules de 11 jours (C) et dans les feuilles caulinaires de plantes âgées de 5 semaines (D) de Col-0 et des mutants *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* (lignée 49) cultivées en conditions de stress salin. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

Dans les feuilles caulinaires, la teneur en γ -butyrobétaine chez Col-0 est de 1,8 ng par mg de matière sèche en conditions de stress salin (Figure 46 D), soit une réduction de 60 % par rapport à la teneur en conditions normales. Chez *KO8-2*, la teneur en γ -butyrobétaine est de 1,12 ng par

mg de matière sèche, soit réduite de 44 % par rapport aux conditions normales. Cela correspond également à une réduction 33 % par rapport à celle de Col-0. Chez *badh*, la teneur en γ -butyrobétaïne est de 1,5 ng mg⁻¹, comparable à celle en conditions normales. Chez *KO8-2 badh*, la teneur en γ -butyrobétaïne est de 0,66 ng par mg de matière sèche en conditions de stress salin, soit une réduction de 91 % par rapport aux plantules cultivées en conditions normales. La teneur en γ -butyrobétaïne est également réduite de 63 % par rapport à Col-0. **Ainsi, en conditions de stress salin, la teneur en γ -butyrobétaïne dans les plantules comme dans les feuilles caulinaires, est réduite par rapport aux conditions normales. De plus, la teneur en γ -butyrobétaïne dans des feuilles caulinaires de *KO8-2* et de *KO8-2 badh* est inférieure à celle de Col-0.**

iii. Dosage de la carnitine

La teneur en carnitine dans les plantules de Col-0 est de 3 pg par mg de matière sèche en moyenne. Celle des mutants *KO8-2* et *KO8-2 badh* est entre 1,5 et 3 pg par mg de matière sèche (Figure 47 A). Les différences ne sont pas significatives. Les feuilles de Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* contiennent toutes 50 pg de carnitine par mg de matière sèche (Figure 47 B). **Dans les plantules comme dans les feuilles caulinaires, la teneur en carnitine est donc comparable chez les quatre génotypes. Elle est très inférieure à la teneur en γ -butyrobétaïne, d'un facteur 10 000 pour les plantules, et 100 pour les feuilles caulinaires.**

Dans les plantules ayant subi un stress salin, la teneur en carnitine est de 31 pg par mg de matière sèche chez Col-0 (Figure 47 C), soit près de 10 fois supérieure à celle dans les plantules cultivées en conditions normales. Celle des mutants *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* est entre 15 et 20 pg par mg de matière sèche, soit comparable à celles des plantules cultivées en conditions normales. Dans les plantules comme dans les feuilles caulinaires, les différences entre les génotypes ne sont pas significatives.

La teneur en carnitine dans les feuilles de plantes ayant subi un stress salin est de 75 pg par mg de matière sèche chez Col-0, *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* (Figure 47 D), soit une augmentation de 50 % par rapport aux conditions normales. **Ainsi, la teneur en carnitine dans les feuilles caulinaires est plus importante que dans les plantules de 11 jours. Dans les plantules comme dans les feuilles, une accumulation de carnitine en réponse au stress salin est mesurée. Cette accumulation, comparable chez les quatre génotypes, est plus importante dans les plantules que dans les feuilles.**

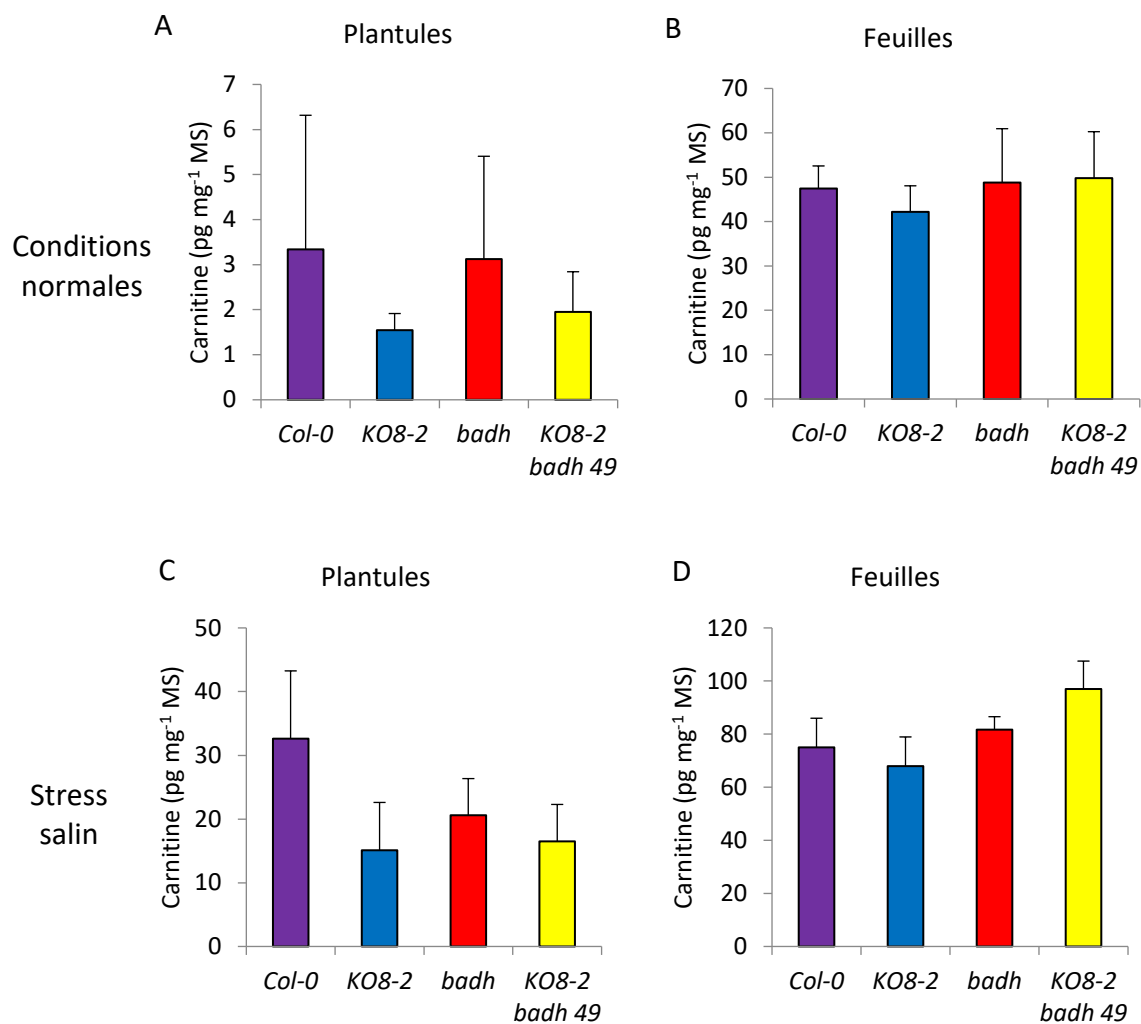


Figure 47 : Teneur en carnitine dans les plantules de 11 jours (A) et dans les feuilles caulinaires de plantes âgées de 5 semaines (B) de Col-0 et des mutants *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* (lignée 49) cultivées en conditions normales. Teneur en carnitine dans les plantules de 11 jours (C) et dans les feuilles caulinaires de plantes âgées de 5 semaines (D) de Col-0 et des mutants *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* (lignée 49) cultivées en conditions de stress salin. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart-type des résultats de 3 expérimentations biologiquement indépendantes. Les astérisques indiquent la significativité des différences entre les mutants et Col-0 en utilisant le test de Student (test T). Les seuils de significativité sont définis par la valeur de P avec * pour $P < 0,05$; ** pour $P < 0,01$; *** pour $P < 0,001$ et **** pour $P < 0,0001$.

En résumé, chez *KO8-2 badh*, la capacité d'oxydation de l'ABAL et du TMABAL est significativement réduite (Tableau 16). Cependant, *KO8-2 badh* n'est affecté ni dans sa teneur en GABA en conditions normales, ni dans l'accumulation de GABA en réponse à un stress salin. A l'inverse, la teneur en γ -butyrobétaine dans les feuilles et les plantules est significativement réduite chez *KO8-2 badh*. La teneur en carnitine reste comparable

au sauvage en conditions normales et augmente de manière comparable en conditions de stress salin.

Tableau 16 : Principales caractéristiques du double mutant *KO8-2 badh* par rapport à Col-0 concernant l'activité des enzymes AtALDH10 et la teneur en métabolites dans les plantules de 11 jours et les feuilles de plante âgée de 5 semaine, en conditions normales ou de stress salin.

	Phénotypes de <i>KO8-2 badh</i> par rapport à Col-0	
	Conditions normales	Conditions de stress salin
Capacité d'oxydation de l'ABAL	Réduite de 33 %	Non mesurée
Capacité d'oxydation du TMABAL	Réduite de 86 %	Non mesurée
Teneur en GABA	Comparable	Comparable
Teneur en γ -butyrobétaine	Réduite de 73 % dans les plantules et de 90 % dans les feuilles caulinaires	Réduite de 63 % dans les feuilles caulinaires et 87 % dans les plantules
Teneur en carnitine	Comparable	Comparable

3. Discussion et perspectives

L'étude des mutants *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* montre que les mutations dans les gènes *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* ont des conséquences sur plusieurs processus physiologiques : la morphogénèse, le développement précoce, la résistance au stress osmotique, la synthèse de γ -butyrobétaine, ainsi que la dégradation des aminoaldéhydes.

a. La morphologie et le développement précoce

Chez le double mutant *KO8-2 badh*, une réduction significative de la longueur des siliques est observée. Elle peut être associée à un nombre important de graines ne parvenant pas à maturité. En effet, chez les brassicacées, la longueur de la silique est corrélée au nombre de graines (Fu *et al.* 2015). Les graines non développées observées dans les siliques pourraient être des ovules non fécondés. Ils sont semblables à ceux observés chez le mutant *feronia*, affecté dans la croissance du tube pollinique (Huck *et al.* 2003). Il est également possible qu'il résulte d'un échec de maturation de la graine. Pour vérifier ces hypothèses, il serait intéressant d'étudier la croissance du tube pollinique chez *KO8-2 badh*. Un protocole consistant à couper le pistil après

pollinisation, à le déposer sur un milieu nutritif gélosé et à visualiser la croissance du tube pollinique dans le milieu (Dickinson *et al.* 2018) pourrait être envisagé. Une autre méthode, consistant à déposer autopolliniser la plante, puis déposer ensuite le pollen sur le même milieu et à suivre la croissance du tube pollinique directement dans le milieu (Dickinson *et al.* 2018) pourrait aussi être employée. Elle permettrait de confirmer ou non que *KO8-2 badh* est affecté dans la fécondation, et de déterminer si le problème de fécondation provient du pistil ou du pollen.

Dans les deux cas, il est possible que la réduction du nombre de graines développées permette à la plante mère d'allouer plus de ressources aux graines qui parviennent à maturité. Cela pourrait expliquer le fait que les graines bien développées de *KO8-2 badh* sont significativement plus lourdes que celles de Col-0, *KO8-2* et *badh*, et comportent une quantité accrue de réserves lipidiques et, surtout, de protéines. De plus, le dosage de l'eicosénoate indique que la quantité initiale de lipides de réserve est plus importante, et qu'elle est ensuite consommée plus rapidement durant le développement précoce de *KO8-2 badh*. Cela peut expliquer l'accumulation plus rapide de matière sèche chez les plantules, liée à une teneur plus élevée en protéines et une accumulation plus rapide d'autres composés, possiblement la cellulose, notamment. Elle est également liée à une synthèse accrue de lipides membranaires durant les 4 premiers jours de développement. La teneur en lipides dans les tissus décroît au cours de la première semaine après germination, notamment du fait de la consommation des TAG. Le développement plus rapide de *KO8-2 badh* et, dans une moindre mesure, de *badh* peut ainsi expliquer leur teneur en lipides par rapport à la matière sèche inférieure dans les tissus. Cela explique également que les plantules de *badh* et *KO8-2 badh* sont proportionnellement enrichies en lipides membranaires et appauvries en TAG.

Ce résultat ne concorde pas avec les travaux publiés selon lesquels les plantules âgées de 7 jours du simple mutant *badh* contiendraient une quantité supérieure en acides gras totaux, due à la rétention de corps lipidiques ne subissant pas la β -oxydation (Cassin-Ross and Hu 2014). A l'inverse, les dosages réalisés ici suggèrent donc que ni *badh* ni *KO8-2 badh* ne sont affectés dans la β -oxydation.

Le développement accéléré de *KO8-2 badh*, et, dans une moindre mesure, de *badh*, est cohérent avec une étude montrant que le développement précoce de la lignée d'*Arabidopsis* surexprimant les gènes *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* est ralenti par rapport à celui de Col-0 (Missihoun et al. 2015). Il est possible que cette lignée soit sujette à un excès de NADH, ce qui perturberait le métabolisme des sucres et des acides aminés, et retarderait la croissance (Missihoun et al.

2015). Un tel déséquilibre a été décrit dans le cas du double mutant *Arabidopsis aldh3 aldh7*, mais n'a été observé que dans les tissus adultes, et non dans les plantules (Missihoun *et al.* 2018). A l'inverse, la perte d'activité de ces enzymes pourrait accroître la disponibilité du NAD⁺, ce qui favorise l'anabolisme et la croissance des plantes, renforcée par une quantité accrue réserves protéiques et lipidiques dans la graine. Ces résultats suggèrent donc que les AtALDH10 ont un lien direct ou indirect avec le contrôle du développement précoce.

De plus, la morphologie de la plante adulte est altérée chez le double mutant *KO8-2 badh*. Le nombre plus important de hampes florales secondaires peut traduire une altération de la dominance apicale. La morphologie, la maturation de la graine et le développement précoce sont des processus physiologiques qui dépendent de l'action de phytohormones. Les AtALDH10 pourraient donc être liées aux voies de signalisation hormonales. Par exemple, les auxines, les cytokinines, l'acide abscissique ou encore les brassinostéroïdes interviennent dans la maturation de la graine, et notamment dans la régulation de sa taille. Ainsi, des siliques de taille réduites et des graines de volume et de masse supérieures à celles de Col-0 sont aussi observées chez le mutant *mnt*, déficient pour la protéine auxine response factor 2 (ARF2), impliquée dans la voie de signalisation de l'auxine (Schruff *et al.* 2005). La réduction du nombre de graines a été signalée chez les mutants *aba2-1* et *abi5*, affectés dans la signalisation de l'acide abscissique (Cheng *et al.* 2014). Ces caractéristiques ont également été rapportées chez des mutants affectés dans la voie de signalisation des cytokinines. Ainsi, les mutants perte de fonction pour trois histidine kinases récepteurs aux cytokinines, sont eux aussi caractérisés par un nombre de graines par silique réduit, et des graines plus lourdes (Riefler *et al.* 2006). De plus, le mutant *supershoot (sps)*, perte de fonction pour SPS, une cytochrome P450 impliquée dans la modulation de la signalisation aux cytokinines, est sujet, comme *KO8-2 badh*, à une importante augmentation du nombre de hampes florales (Tantikanjana *et al.* 2001). A l'inverse, les brassinostéroïdes régulent positivement la taille de la graine. Les graines du mutant brassinostéroïde déficient *det-2* sont plus petites (Jiang *et al.* 2013). De plus, les brassinostéroïdes, en réprimant le facteur de transcription ARF2, ont un effet antagoniste aux auxines (Jiang *et al.* 2013). Enfin, une réduction de la taille des siliques, associée à une augmentation de la masse des graines, est également rapportée chez le mutant *grdp1*, perte de fonction pour la protéine glycine rich-domain containing protein 1 (GRDP1). C'est une protéine à domaine riche en glycine, impliquée dans la voie de signalisation à l'acide abscissique et qui joue un rôle dans la maturation des fruits et des graines (Rodríguez-Hernández *et al.* 2017). Ainsi, les ALDH10 pourraient réguler positivement la voie de signalisation des cytokinines,

des auxines et de l'acide abscissique, ou réguler négativement la voie de signalisation aux brassinostéroïdes. Il serait donc envisageable de doser par spectrométrie de masse les auxines, les cytokinines, l'acide abscissique et les brassinostéroïdes chez le mutant *KO8-2 badh*, pour confirmer un lien éventuel entre les AtALDH10 et les voies de signalisation hormonales.

Les AtALDH10 pourraient également être liées à la production d'autres composés impliqués dans l'architecture de la plante et le développement des siliques et des graines. Une réduction de la taille des siliques et une augmentation de la masse des graines sont également observées chez le mutant *bus1-1*, perte de fonction pour une cytochrome P450 : CYP79F1, impliquée dans la synthèse de glucosinolates dérivés de la méthionine (Reintanz *et al.* 2001). Or, certaines ALDH10 sont capables d'oxyder le 3-diméthylsulfuropropionaldéhyde (DMSPAL), un composé issu de la dégradation de la méthionine, en 3-diméthylsulfuropropionate (DMSP). C'est le cas d'une ALDH10 de la betterave, des trois ALDH10 du maïs et des deux ALDH10 de la tomate (Kopečný *et al.* 2013; Trossat *et al.* 2016). Il est donc plausible que les ALDH10 influent sur la disponibilité de la méthionine pour la production de glucosinolates. Plus généralement, il est possible que les AtALDH10 soient impliquées dans la production de composés issus de la dégradation d'acides aminés ou de polyamines. Il pourrait être intéressant de doser le DMSP et les glucosinolates par LC-MS (Crocoll *et al.* 2016) dans les tissus de *KO8-2 badh* comparativement aux plantes sauvages pour explorer cette hypothèse.

b. Rôle des ALDH10 dans le catabolisme des polyamines

Chez les plantes, le β -alanine et le GABA peuvent être issus de la dégradation des polyamines (Shelp *et al.* 2012). Ces composés, tels que la spermine, la spermidine, la cadavérine et la putrescine, pourraient être impliquées dans plusieurs processus biologiques. Elles régulent positivement la division cellulaire et interviennent dans la régulation de la croissance et de l'architecture des plantes, pourraient jouer un rôle dans la signalisation hormonale, l'embryogenèse, la croissance du tube pollinique et le développement du fruit (Evans and Malmberg 1989; Galston *et al.* 1997) ou encore les réponses au stress (Bouchereau *et al.* 1999).

Elles peuvent être dégradées dans le peroxyosome et dans le plaste. Dans le peroxyosome, les polyamine oxydases (PAO, EC 1.5.3.14) 2, 3 et 4 convertissent la spermine et la putrescine en APAL (Fincato *et al.* 2012). Les Copper diamine oxydases (CuAO, EC 1.4.3.22) 2 et 3 catalysent l'oxydation de la putrescine en ABAL (Xing *et al.* 2007; Planas-Portell *et al.* 2013). Dans le plaste, la présence de AtCuAO n'est pas connue à ce jour, mais des analyses *in silico* prédisent qu'elle pourrait être présente (Planas-Portell *et al.* 2013). L'APAL et l'ABAL,

aminoaldéhydes toxiques, peuvent ensuite être détoxifiés en β -alanine et en GABA par AtALDH10A8 et AtALDH10A9, dans le plaste et le peroxyosome, respectivement (Zarei *et al.* 2016). Les deux isoenzymes pourraient donc être en charge de la dégradation de l'APAL et l'ABAL issus de la dégradation des polyamines dans leurs organites respectifs.

Des études ont suggéré un lien entre les AtALDH10 et le métabolisme des polyamines. Ainsi, la surexpression de *AtALDH10A8* et *AtALDH10A9* chez *Arabidopsis* a un effet sur le métabolisme de certains polyamines : la spermidine et la cadavérine sont présentes en quantité inférieures en conditions de stress salin (Missihoun *et al.* 2015). Concernant *KO8-2 badh*, le développement plus rapide des plantules, l'architecture de la plante, caractérisée par des hampes florales plus hautes et un nombre de plus important de hampes florales secondaires, l'échec de fécondation ou de maturation des graines et la sensibilité au stress salin suggèrent que ce mutant serait affecté dans le métabolisme des polyamines. Il serait donc intéressant de quantifier les polyamines par spectrométrie de masse dans les tissus des mutants *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh*.

Il est également possible que les mutants *KO8-2* et *badh* soient incapables de dégrader l'APAL et l'ABAL résultants du catabolisme des polyamines, dans les plastes et les peroxyosomes, respectivement. Le double mutant *KO8-2 badh* pourrait être sujet à une accumulation d'aminoaldéhydes, qui, du fait de leur toxicité, pourraient également générer les problèmes de fécondation ou de développement des graines observés. Il serait donc intéressant de doser les aminoaldéhydes tels que le TMABAL et l'ABAL, de manière à confirmer une éventuelle accumulation dans les tissus.

c. Rôle des AtALDH10 dans la voie de biosynthèse de la carnitine

i. Rôle dans la production de γ -butyrobétaïne

Les dosages d'activité ALDH10 des extraits protéiques totaux de plantules, et les quantifications de γ -butyrobétaïne dans les tissus adultes ont permis de montrer ici le rôle des AtALDH10 dans la synthèse de γ -butyrobétaïne *in planta*. Ainsi, en comparaison de Col-0, les deux simples mutants *KO8-2* et *badh* ainsi que le double mutant *KO8-2 badh* sont affectés à la fois dans leur capacité à oxyder le TMABAL, et dans leur teneur en γ -butyrobétaïne. Le double mutant *KO8-2 badh* est plus affecté que chacun des deux simples mutants. Ces résultats montrent que les deux isoenzymes AtALDH10 sont impliquées dans la conversion de TMABAL en γ -butyrobétaïne.

Néanmoins, le double mutant *KO8-2 badh* n'est pas totalement incapable de convertir le TMABAL en γ -butyrobétaine. Il subsiste une activité résiduelle d'oxydation du TMABAL, et une teneur résiduelle en γ -butyrobétaine, équivalant à environ 10 % de celles de Col-0. Or, le simple mutant *badh*, et donc aussi le double mutant *KO8-2 badh*, pourraient ne pas être des mutants perte de fonction totale pour AtALDH10A9. En effet, chez *badh*, des transcrits *AtALDH10A9* sont détectés avec des amorces spécifiques de la partie 3' du gène, mais pas avec des amorces spécifiques de la partie 5'. Il n'est donc pas exclu que des protéines AtALDH10A9 incomplètes puissent être produites. Il serait intéressant de réaliser des RT-PCR quantitatives avec des amorces s'hybridant à proximité du T-DNA, correspondant à la partie C-terminale de la protéine AtALDH10A9, pour déterminer la position exacte où elle pourrait être tronquée. Une fois cette position identifiée, il serait envisageable de produire des protéines ALDH10A9 recombinantes incomplètes, et d'étudier sa fonctionnalité sur le TMABAL. Si la protéine incomplète conserve une capacité résiduelle à prendre en charge le TMABAL, cela pourrait expliquer la capacité résiduelle de *KO8-2 badh* à prendre en charge le TMABAL et à produire de la γ -butyrobétaine. Néanmoins, les phénotypes du double mutant *KO8-2 badh* concernant la morphologie, le développement précoce et les quantifications de métabolites sont plus marqués que ceux des simples mutants. Cela confirme la perte d'activité importante pour AtALDH10A9 chez *badh* et *KO8-2 badh*.

L'activité résiduelle de synthèse de γ -butyrobétaine pourrait également s'expliquer par l'activité des enzymes de la même superfamille ALDH. En effet, chez le pois et le maïs, l'enzyme ALDH7 est capable d'oxyder un grand nombre d'aldéhydes, dont l'AASAL, le TMAPAL, le GBAL, mais aussi, plus faiblement, le TMABAL (Koncitikova et al. 2015). Les ALDH7 sont hautement conservées chez les plantes du point de vue de la séquence et de la structure (Kirch *et al.* 2004). Le génome d'*Arabidopsis* comporte un gène codant pour une enzyme de cette famille : AtALDH7B4 (Kirch *et al.* 2004). Cette enzyme pourrait donc être responsable d'une activité résiduelle de conversion du TMABAL en γ -butyrobétaine chez *KO8-2 badh*. Pour étayer cette hypothèse, il serait intéressant de caractériser *in vitro* l'activité de l'enzyme AtALDH7B4 recombinante. D'autre part, plusieurs mutants portant un T-DNA dans la région codante du gène *AtALDH7B4* sont disponibles dans la collection GABI-Kat (<https://www.gabi-kat.de/>) (Li *et al.* 2007), et qui n'ont pas fait l'objet d'une caractérisation. Il serait intéressant de caractériser un ou plusieurs de ces mutants et de confirmer s'ils sont affectés dans la production de γ -butyrobétaine. L'obtention et l'étude d'un triple mutant *KO8-*

2 *badh ald7b4* pourrait être envisagée, afin de vérifier s'il est ou non complètement incapable de synthétiser la γ -butyrobétaine.

La concentration en γ -butyrobétaine dans les plantules et dans les feuilles de Col-0 est très supérieure à celles de la carnitine, d'un facteur 100 à 10 000 selon les tissus. Cela suggère que la majeure partie de la γ -butyrobétaine n'est pas destinée à être convertie en carnitine en conditions normales chez *Arabidopsis*. Cela soulève la question d'un rôle éventuel de la γ -butyrobétaine autre que dans la synthèse de carnitine. Pour l'instant, ce composé n'est connu que comme un précurseur de la carnitine et n'a pas de rôle décrit dans la fécondation et le développement précoce. Cependant, un lien éventuel ne peut être exclu. Comme la carnitine exogène, la γ -butyrobétaine exogène module l'activité de gènes impliqués dans la réponse au stress salin et le métabolisme de l'acide abscissique (Charrier 2011). Il est donc possible que la γ -butyrobétaine puisse être liée aux voies de signalisation du stress et des phytohormones. Néanmoins, la baisse de la teneur en γ -butyrobétaine en réponse au stress salin ne plaide pas dans ce sens.

ii. Hypothèses concernant la biosynthèse de la carnitine

Chez les animaux et les levures, la carnitine est synthétisée à partir de la 6-N-triméthyllysine (TML) *via* 4 réactions enzymatiques. La TML est d'abord hydroxylée en 3-hydroxy-6-N-triméthyllysine (HTML) par la TML dioxygénase (TMLD). La HTMLA est ensuite convertie en TMABAL par la HTML aldolase (HTMLA). Le TMABAL est oxydé en γ -butyrobétaine par la TMABAL déshydrogénase (TMABADH). Enfin, la γ -butyrobétaine est convertie en carnitine par la butyrobétaine dioxygénase (BBD) (Strijbiss et al. 2009; Strijbis, Vaz, and Distel 2010; Vaz and Wanders 2002).

L'identification et la quantification de TML, de γ -butyrobétaine et de carnitine chez les plantes a permis de supposer que la biosynthèse de la carnitine chez les plantes pourrait suivre les mêmes étapes que chez les animaux et les levures (Rippa *et al.* 2012). Le fait que les AtALDH10 partagent 38 % d'identité avec l'ALDH9 humaine suggère qu'elles seraient également impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine en catalysant la conversion du TMABAL en γ -butyrobétaine (Rippa *et al.* 2012). Le rôle des AtALDH10 dans la synthèse de γ -butyrobétaine *in planta* a été montrée ici, ce qui supporte l'hypothèse selon laquelle elles interviendraient dans la voie de biosynthèse de carnitine. Pourtant, la teneur en carnitine n'est affectée ni dans les plantules ni dans les feuilles du double mutant *KO8-2 badh*. La disponibilité moindre de la γ -butyrobétaine n'impacte donc pas la teneur en carnitine. Or, au moins chez les

plantules, il est impossible que la carnitine soit importée du milieu de culture. En effet, les plantules ont été cultivées en conditions axéniques sur un milieu nutritif gélosé, ne contenant pas de carnitine.

Cependant, dans les feuilles et les plantules de *KO8-2 badh*, la concentration en γ -butyrobétaïne, bien que réduite en comparaison de Col-0, est encore très supérieure à la concentration en carnitine. Il est donc possible que la teneur résiduelle en γ -butyrobétaïne soit suffisante pour maintenir une concentration adéquate en carnitine. Une baisse de la disponibilité de la γ -butyrobétaïne pourrait aussi entraîner une régulation positive de l'expression du gène codant pour l'enzyme en charge de sa conversion de la γ -butyrobétaïne en carnitine chez *KO8-2 badh*. Il est aussi envisageable que la carnitine soit synthétisée d'une autre manière. Chez les bactéries, elle peut être synthétisée à partir de la crotonobétaïne (Engemann *et al.* 2001). Si actuellement la crotonobétaïne n'a jamais été identifiée chez les plantes, une autre voie de synthèse de la carnitine ne peut être exclue. Chez les plantes, des homologues des enzymes bactériennes impliquées dans la biotransformation de la crotonobétaïne en carnitine sont nombreuses, la plupart ayant des fonctions connues (de type énoyl-CoA hydratase). Il n'est pas exclu qu'une ou plusieurs d'entre elles puissent intervenir aussi dans la conversion de la crotonobétaïne en carnitine. En l'absence de standard interne disponible dans le commerce, le marquage de la crotonobétaïne avec du deutérium et son incorporation au milieu de culture des plantules pourrait permettre d'étudier sa possible transformation en carnitine par spectrométrie de masse.

d. Rôle des ALDH10 dans la protection contre le stress osmotique

Les micro-organismes, les animaux et les plantes accumulent des molécules en réponse au stress osmotique pouvant atteindre des concentrations élevées dans les tissus biologiques sans perturber les fonctions cellulaires (Yancey *et al.* 1982; Yancey 2005). Ces composés dits compatibles peuvent être des sucres, des polyols, des acides aminés, ou encore des composés à ammonium quaternaires tels que la glycine bétaïne ou la carnitine (Rhodes and Hanson 1993; Yancey 2005). Certaines plantes, comme l'orge et l'épinard, sont ainsi capables d'accumuler des quantités élevées de glycine bétaïne, un osmoprotectant extrêmement efficace (Le Rudulier *et al.* 1984). En revanche, *Arabidopsis* n'est pas capable de manière importante la glycine bétaïne en réponse au stress (Hibino *et al.* 2002). Le fait que les simples mutants *KO8-2* et *badh* montrent une sensibilité accrue au stress salin a permis de suggérer que les ALDH10 d'*Arabidopsis* sont impliquées dans la résistance au stress osmotique (Missihoun *et al.* 2011;

Zarei *et al.* 2016). Cependant, cette sensibilité accrue des simples mutants n'a pas été confirmée dans nos conditions. Le double mutant *KO8-2 badh* est quant à lui effectivement plus sensible au stress salin. Nos travaux confirment donc l'implication des AtALDH10 dans la résistance au stress salin, ce qui suggère qu'elles puissent être impliquées dans la synthèse d'osmoprotectants, comme le GABA.

e. Rôle des ALDH10 dans la synthèse de GABA

Les résultats obtenus ici suggèrent que chacune des deux AtALDH10 est capable d'oxyder *in vitro* l'ABAL en GABA (Chapitre A). Toutefois, les mutants *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh* ne sont significativement affectés, ni en conditions normales, ni en conditions de stress, dans leur teneur en GABA et dans son accumulation en réponse au stress salin. Ce résultat ne confirme pas les données montrant que les AtALDH10 sont impliquées dans l'accumulation de GABA en réponse au stress, et que cette accumulation serait réduite chez les mutants *KO8-2* et *badh* (Zarei *et al.* 2016).

Cependant, les ALDH10 ne sont pas la seule voie de synthèse du GABA chez les plantes. D'autres enzymes de la superfamille ALDH sont aussi capables d'oxyder l'ABAL. Les ALDH7 du pois et du maïs sont aussi modérément actives sur l'ABAL. C'est également le cas chez le maïs de ALDH2 (Končítíková *et al.* 2015), ALDH3 et ALDH12. Chez Arabidopsis, trois ALDH2 sont identifiées : ALDH2B7 et ALDH2B4, toutes deux mitochondriales et partageant 75 % d'identité, ainsi que ALDH2C4 qui est cytosolique (Kirch *et al.* 2004). Trois ALDH3 existent chez Arabidopsis : ALDH3F1, localisée dans le réticulum endoplasmique (Dunkley *et al.* 2006), ALDH3I1, localisée dans les plastes des feuilles (Kleffmann *et al.* 2004) et ALDH3H1, localisée dans l'appareil de Golgi, la vacuole, et le réticulum endoplasmique (Dunkley *et al.* 2006). Elles sont impliquées dans la détoxification d'aldéhydes. Une ALDH12 existe chez Arabidopsis : ALDH12A1 qui est impliquée dans la dégradation de la proline en glutamate (Deuschle *et al.* 2001, 2004). L'activité de ces enzymes peut expliquer la capacité résiduelle d'oxydation de l'ABAL par les extraits protéiques de *KO8-2*, *badh* et *KO8-2 badh*.

En outre, le GABA peut également être synthétisé indépendamment de l'ABAL. Chez Arabidopsis, la glutamate décarboxylase (GAD, EC 4.1.1.15) convertit le glutamate en GABA (Shelp *et al.* 1999; Bouché and Fromm 2004). Au contraire de *KO8-2 badh*, les mutants *gad* sont très fortement affectés dans la capacité à accumuler le GABA en réponse au stress (Bouché and Fromm 2004). Ainsi, les ALDH10 ne semblent pas être la voie majoritaire de production de GABA chez les plantes.

f. Rôles spécifiques des isoenzymes AtALDH10

La capacité des simples mutants *KO8-2* et *badh* à oxyder l'ABAL et le TMABAL ainsi que leur teneur en γ -butyrobétaïne dans les feuilles caulinaires, sont significativement réduites, mais pas autant que chez le double mutant *KO8-2 badh*. Même si le phénotype de *badh* est parfois intermédiaire entre celui de Col-0 et *KO8-2* et celui de *KO8-2 badh*, concernant la vitesse de développement et les teneurs en lipides dans les plantules, les simples mutants *KO8-2* et *badh* ne sont pas affectés dans la plupart des processus physiologiques étudiés ici. La taille de la hampe florale et celles des siliques, et le nombre de graines par silique (légèrement réduit chez *badh*) sont comparables à celles de Col-0. De la même manière, les réserves d'amidon, de lipides et de protéines dans les graines ne sont pas affectées. Enfin, les simples mutants, contrairement à *KO8-2 badh*, ne sont pas sensibles au stress salin dans nos conditions.

Ainsi, malgré la localisation cellulaire différente des deux isoenzymes (Missihoun et al. 2011), et malgré le fait que la perte de fonction pour une ALDH10 n'entraîne pas une augmentation de l'expression de l'autre isoenzyme, il semble qu'il existe une redondance fonctionnelle entre AtALDH10A8 et AtALDH10A9. En effet, la perte de fonction (totale pour *KO8-2*, possiblement partielle pour *badh*) pour AtALDH10A8 ou AtALDH10A9 est compensée par l'autre isoenzyme. Malgré le fait qu'il existe une différence d'expression entre les deux isoenzymes en fonction des organes (Chapitre A), aucune spécificité d'organe de AtALDH10A8 ou AtALDH10A9 n'a été mise en évidence. Le fait que les deux isoformes soient ubiquitaires, et exprimées dans tous les organes testés, pourrait expliquer cette compensation.

La caractérisation *in vitro* des AtALDH10 et des mutants d'*Arabidopsis* suggère que les AtALDH10 puissent être impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine. Cependant, contrairement aux animaux et aux levures, les enzymes intervenant dans d'autres étapes de la voie de biosynthèse de la carnitine ne sont pas connues chez les plantes. Les enzymes liées et à l'activité de transport des acides gras et de l'acétate par la carnitine ne sont pas non plus identifiées. Afin d'étudier une possible implication d'autres protéines d'*Arabidopsis* dans le métabolisme de la carnitine, des approches complémentaires ont été employées. Elles ont pour but d'identifier des protéines potentiellement impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine chez les plantes ou dans le transport d'acides gras ou d'acétate lié à la carnitine.

C. Recherche de nouvelles enzymes impliquées dans la biosynthèse et le métabolisme associé à la carnitine chez les plantes

Le métabolisme de la carnitine chez les plantes demeure mal connu. Il est vraisemblable que la voie de biosynthèse et le rôle dans le transport des acides gras impliquent les mêmes activités enzymatiques que chez les animaux et les levures. Actuellement, aucun candidat n'est identifié chez les plantes pour deux des quatre étapes de la voie de biosynthèse de la carnitine (Rippa *et al.* 2012). Les carnitine acyl(acétyl)transférases, impliquées dans le transport des acides gras par la carnitine, ne sont pas non plus identifiées chez les plantes. Un travail de recherche bioinformatique d'enzymes potentiellement impliquées dans la voie de biosynthèse et le métabolisme associé à la carnitine a été réalisé. Plus précisément, une recherche exhaustive d'homologues portant sur la structure des protéines, et non seulement sur la séquence, a été réalisée en s'appuyant sur les enzymes animales de structure connue.

1. Recherche d'enzymes de la voie de biosynthèse de la carnitine chez les plantes

La voie de biosynthèse de la carnitine est bien caractérisée chez les animaux (Vaz and Wanders 2002) et les levures (Strijbiss *et al.* 2009). Elle est synthétisée à partir de la 6-N-triméthyllysine (TML) *via* 4 réactions, catalysées par les enzymes TML dioxygénase (TMLD), HTML aldolase (HTMLA) puis TMABAL déshydrogénase (TMABADH). La γ -butyrobétaïne est le précurseur direct de la carnitine, après l'action de la butyrobétaïne dioxygénase (BBD) (Strijbiss *et al.* 2009; Strijbis, Vaz, and Distel 2010; Vaz and Wanders 2002).

Notre laboratoire a détecté et quantifié la carnitine, la TML et la γ -butyrobétaïne dans des plantules d'*Arabidopsis* (Rippa *et al.* 2012, Chapitre B). De plus, l'ajout de TML deutérée chez les plantes conduit à la détection de γ -butyrobétaïne et de carnitine deutérées. Ces résultats ont permis de supposer que la biosynthèse de la carnitine chez les plantes pourrait suivre les mêmes étapes que chez les animaux et les levures (Rippa *et al.* 2012). Notre laboratoire a également entamé une recherche bioinformatique d'enzymes pouvant intervenir dans la biosynthèse de la carnitine chez *Arabidopsis*. A partir des séquences des enzymes humaine et fongique, une recherche d'homologues utilisant l'outil BLAST, (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a permis d'identifier chez *Arabidopsis* des candidats pour la deuxième étape et la troisième étape. Cependant, aucun candidat n'a pu être identifié pour la première et la quatrième étape (Rippa

et al. 2012; Zhao 2014). Il est généralement considéré que pour avoir la même activité biologique, deux enzymes doivent partager au moins 30 % d'identité de séquence. Cependant, certains auteurs ont montré qu'une homologie significative peut exister entre des protéines partageant moins de 30 % d'identité (Joshi and Xu 2007; Pearson 2013). Mais dans ce cas, l'homologie entre ces protéines est identifiable par une « expect value » (E value, qui correspond à l'espérance de trouver un score du fait du hasard) significative (Pearson 2013). Or les analyses réalisées ici n'ont permis d'identifier aucune protéine végétale partageant une E value significative avec la BBD humaine. Pourtant, l'ajout dans le milieu de culture de 3-(2,2,2-triméthylhydrazine)propionate, connu pour être un inhibiteur de la BBD humaine, conduit à une baisse de la teneur en carnitine dans les tissus d'*Arabidopsis* (Rippa *et al.* 2012). Cela suggère que, malgré l'absence d'homologie de séquence, l'enzyme végétale en charge synthèse de la carnitine pourrait partager des caractéristiques biochimiques comparables avec la BBD humaine.

Les recherches des enzymes responsables des première et quatrième étapes de la voie de biosynthèse de la carnitine par homologie de séquence chez *Arabidopsis* n'ont pas permis d'identifier de candidats. Dans le cadre de cette thèse, la recherche par bioinformatique d'enzymes potentiellement impliquées dans ces activités a été poursuivie. Tout d'abord une recherche exhaustive par homologie de séquence en utilisant l'outil BLAST a été réalisée chez l'ensemble des plantes. Ensuite, une méthode utilisant l'homologie structurale des protéines a été employée. Cette approche repose sur les blocs protéiques, un alphabet structural qui assigne des structures tridimensionnelles à des séquences particulières. L'algorithme fold recognition using a structural alphabet (FORSA, <http://www.bo-protscience.fr/forsa/>) (Mahajan *et al.* 2015) utilise les blocs protéiques pour calculer les probabilités conditionnelles qu'une séquence adopte un repliement donné. Ce calcul permet d'assigner des structures connues à des séquences d'acides aminés particulières. Cet outil permet ainsi de prédire la conformation possible d'une protéine à partir de sa séquence. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Pr. Bernard Offmann, du laboratoire Fonctionnalité et Ingénierie des Protéines de l'Université de Nantes.

a. Recherches de candidats par homologie de séquence

Dans le cadre de cette thèse, une recherche d'homologie de séquence a été réalisée pour rechercher des candidats BBD et TMLD chez l'ensemble des plantes. Un BLASTp a été réalisé avec les séquences protéiques des BBD et TMLD. Cette recherche a permis d'identifier chez

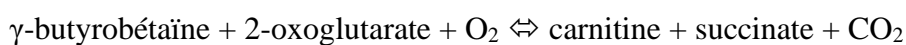
les plantes terrestres trois protéines présentant une homologie significative avec les BBD et TMLD humaines et fongiques.

D'après la base de données national center for biotechnology information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) deux de ces protéines sont issues du protéome du chêne-liège *Quercus suber*. La protéine XP_023909931.1 dénommée « triméthyllysine dioxygénase-like » partage 27 % d'identité avec la BBD humaine et 35 % d'identité avec la TMLD humaine (E value = 8.10^{-28} et 8.10^{-59} , respectivement). La protéine non caractérisée XP_023911808.1, dénommée « LOC112023428 » partage 27 % d'identité avec la BBD humaine et 24 % d'identité avec la TMLD humaine (E value = 1.10^{-26} et 6.10^{-24} , respectivement). La troisième protéine identifiée chez les plantes par cette approche est une « clavamate synthase-like » (référence NCBI OAY79702.1) d'*Ananas comosus* (E value = 3,3) et partageant 24 % d'identité avec la partie C-terminale de la TMLD humaine. Cette E value n'est pas suffisante pour pouvoir considérer cette protéine comme une BBD potentielle.

Cependant, aucun homologue des protéines XP_023909931.1 et XP_023911808.1 de *Q. suber* n'a pu être identifié chez *Arabidopsis* avec l'outil BLASTp. En revanche, chez les champignons, des homologues de ces deux protéines, identifiés comme des triméthyllysine dioxygénases, et des enzymes non caractérisées d'un grand nombre d'espèces ont été identifiées par l'outil BLASTp. La plus proche est celle de *Ramularia colo-cygni*, avec une E value 3.10^{-162} et 59 % d'identité. Cette homologie élevée entre les protéines de *Q. suber* et les enzymes fongiques, ainsi que l'absence d'homologues chez les plantes suggèrent que XP_023909931.1 et XP_023911808.1 ne sont pas des protéines de *Q. suber*, mais celles d'un champignon. Il est possible que ces séquences soient issues d'un endophyte ayant contaminé des échantillons de *Q. suber*. **Ainsi, aucune BBD ou TMLD potentielle n'a pu être identifiée par recherche d'homologie de séquence chez les plantes.**

b. Recherche de candidats par homologie structurale

Une recherche de protéines dont la structure prédite par sa séquence pourrait être proche de celle de la BBD humaine a été réalisée dans le protéome d'*Arabidopsis*. La BBD humaine catalyse la réaction :



La structure de la BBD humaine a été élucidée (Tars et al. 2010). Elle est disponible dans la base de données protein database (PDB) sous la référence 4bg1. Elle comprend un site

catalytique C-terminal composé de deux histidines (His202 et His347) et d'un acide aspartique (Asp204) impliqués dans la chélation d'un cation bivalent Fe^{2+} .

Des enzymes dont la structure prédite par les blocs protéiques serait homologue à la structure de la BBD humaine ont été recherchées parmi les 35381 protéines d'Arabidopsis, en utilisant l'outil FORSA. Cette recherche a permis d'identifier NP_188773.1 (référence Q9LIG0 dans la base de données Uniprot), une protéine non caractérisée d'Arabidopsis, comme ayant une structure prédite fortement semblable à celle de la BBD humaine. Elle partage une compatibilité élevée (score Z = 48, un score Z supérieur à 7,5 étant considéré comme significatif) avec le repliement domaine C-terminal de la BBD humaine. Elle partage 19,85 % d'identité avec la BBD humaine, et 23,19 % avec la TMLD humaine. NP_188773.1 est une protéine de 37,22 kDa comportant 330 acides aminés. D'après les informations disponibles dans la base de données Protein family (<https://pfam.xfam.org/>), elle appartient à la classe des oxydoréductases et à la famille des gamma-butyrobétaïne hydroxylases. Elle est dénommée « clavamate synthase-like protein » dans les bases de données Uniprot et the Arabidopsis information resource (TAIR, <https://www.arabidopsis.org/>). Cette protéine a été identifiée dans le protéome du noyau (Bae *et al.* 2003).

La structure cristalline de NP_188773.1 a été élucidée en 2004 (Bitto *et al.* 2005), et affinée en 2007 (Levin *et al.* 2007). Elle est disponible dans la base de données protein database (PDB) : 1Y0Z (2,4 Å) et 2Q4A (2,39 Å) (Figure 48). Les structures montrent que cette protéine est dimérique (Figure 48 A) et comporte trois sites de chélation d'ions Fe^{2+} : His120, Glu122, et His313 (Figure 48 B), qui remplissent la même fonction que His202, His347 et Asp204 de la BBD humaine. D'après les bases de données, il est également suggéré, par similarité, que cette protéine utilise le 2-oxoglutarate comme cosubstrat.

L'ensemble de ces données suggèrent donc que la protéine d'Arabidopsis NP_188773.1 a une structure proche de celle de la BBD humaine, et qu'elle catalyse le même type de réaction.

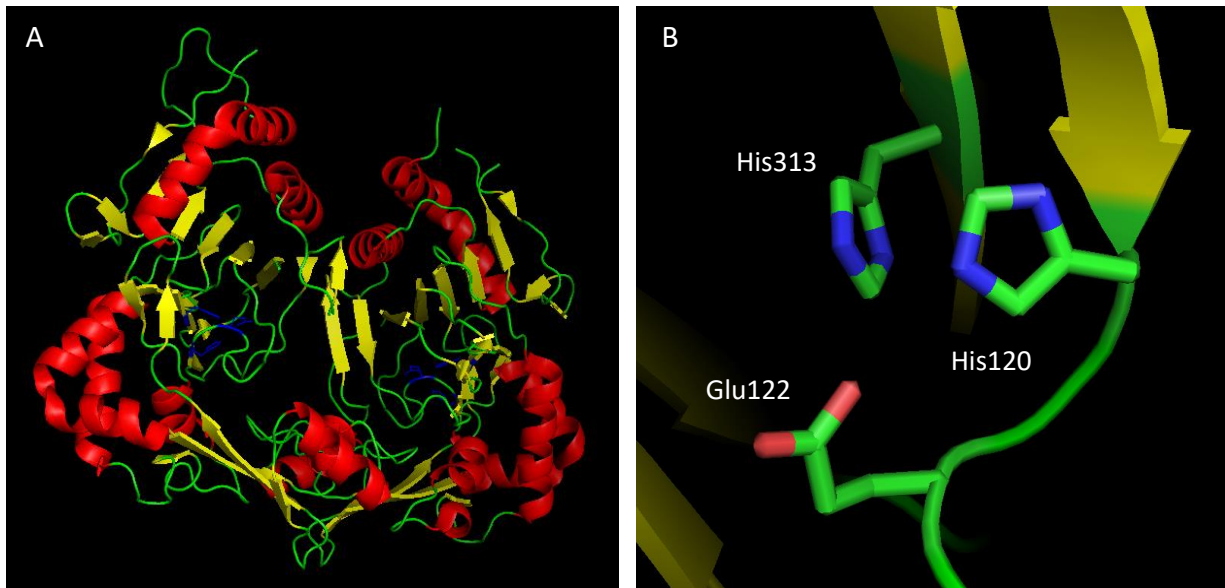


Figure 48 : Structure tridimensionnelle de la protéine NP_188773.1, sous forme de dimère. Les hélices α sont représentées en rouge, les feuillets β sont représentés en jaune, les boucles en vert et les sites de fixation du cation en bleu (A) et détail du site de fixation du cation, avec représentation des chaînes latérales des trois acides aminés catalytiques (His120, Glu122 et His313) (B). Cette figure a été réalisée au moyen du logiciel PyMol.

c. Etude bioinformatique de la protéine NP_188773.1

La structure de la BBD humaine a été alignée avec celle de NP_188773.1 dans le logiciel PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.) (Figure 49 A). Le « root mean square deviation of atomic positions » (RMSD) a été calculé. Il correspond à la distance moyenne en Å entre les atomes des protéines superposées. Le RMSD de l'alignement du domaine catalytique de la BBD humaine avec NP_188773.1 est de 2,8 Å. **La structure du site catalytique de NP_188773.1 est donc très proche de celle de la BBD humaine. En particulier, les trois acides aminés catalytiques se superposent très bien** (Figure 49 B).

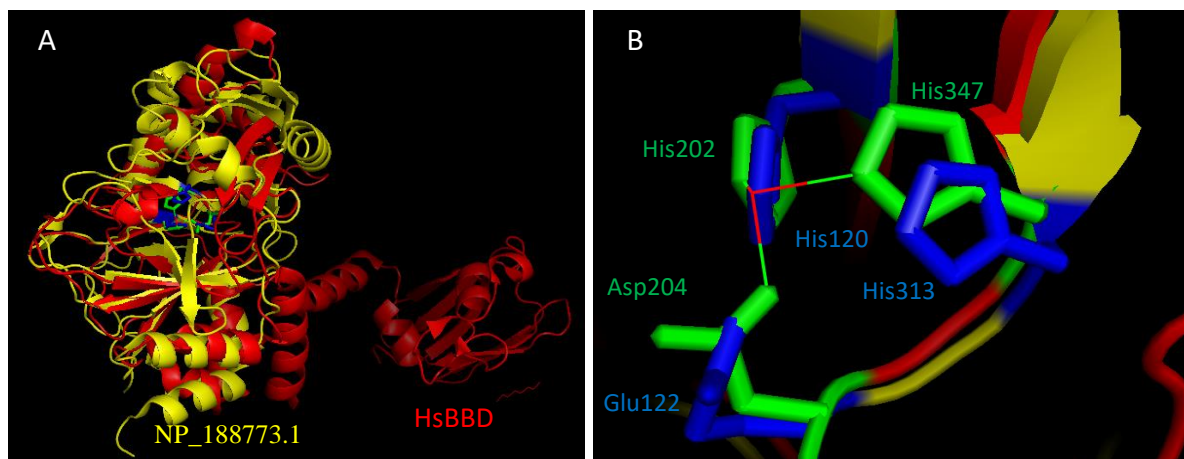


Figure 49 : Superposition de la protéine NP_188773.1 (en jaune) avec la BBD humaine (HsBBD, en rouge) (A). Détail de la superposition des acides aminés catalytiques His120, Glu122 et His313 de NP_188773.1 (en bleu) avec His202, Asp204 et His347 de la BBD humaine (en vert) (B). Cette superposition a été réalisée au moyen du logiciel PyMol.

Des homologues de NP_188773.1 partageant plus de 50 % d'identité de séquence sont présents chez tous les principaux groupes de plantes : les bryophytes, les lycophytes, les monocotylédones et les eudicotylédones. Certains sont identifiés chez les champignons. La majorité sont des protéines non caractérisées. Elles sont annotées comme étant des « clavamate synthase-like proteins » ou des TauD/TfdA (taurine catabolism dioxygenase). Les « clavamate synthases-like proteins » sont proches des clavamate synthases (EC 1.14.11.21), des enzymes bactériennes impliquées dans la conversion du dihydroclavamate en clavamate. Le clavamate est un intermédiaire de la voie de biosynthèse de l'acide clavulanique, un inhibiteur de la β -lactamase. Les taurine dioxygénases sont impliquées dans la conversion de la taurine en aminoacétaldéhyde. Elles utilisent le 2-oxoglutarate comme cosubstrat, et produisent aussi du succinate. Ces enzymes portent toutes la triade catalytique H-X-E-X(n)-H (Figure 50). Elles ont toutes une activité oxygénase Fe(II)-dépendante. Ainsi, **NP_188773.1 appartient à une famille présente chez les plantes, utilisant le même cosubstrat, mais actuellement aucune n'a été liée à la voie de biosynthèse de la carnitine.** NP_188773.1 est une candidate possible pour catalyser la conversion de la γ -butyrobétaine en carnitine.

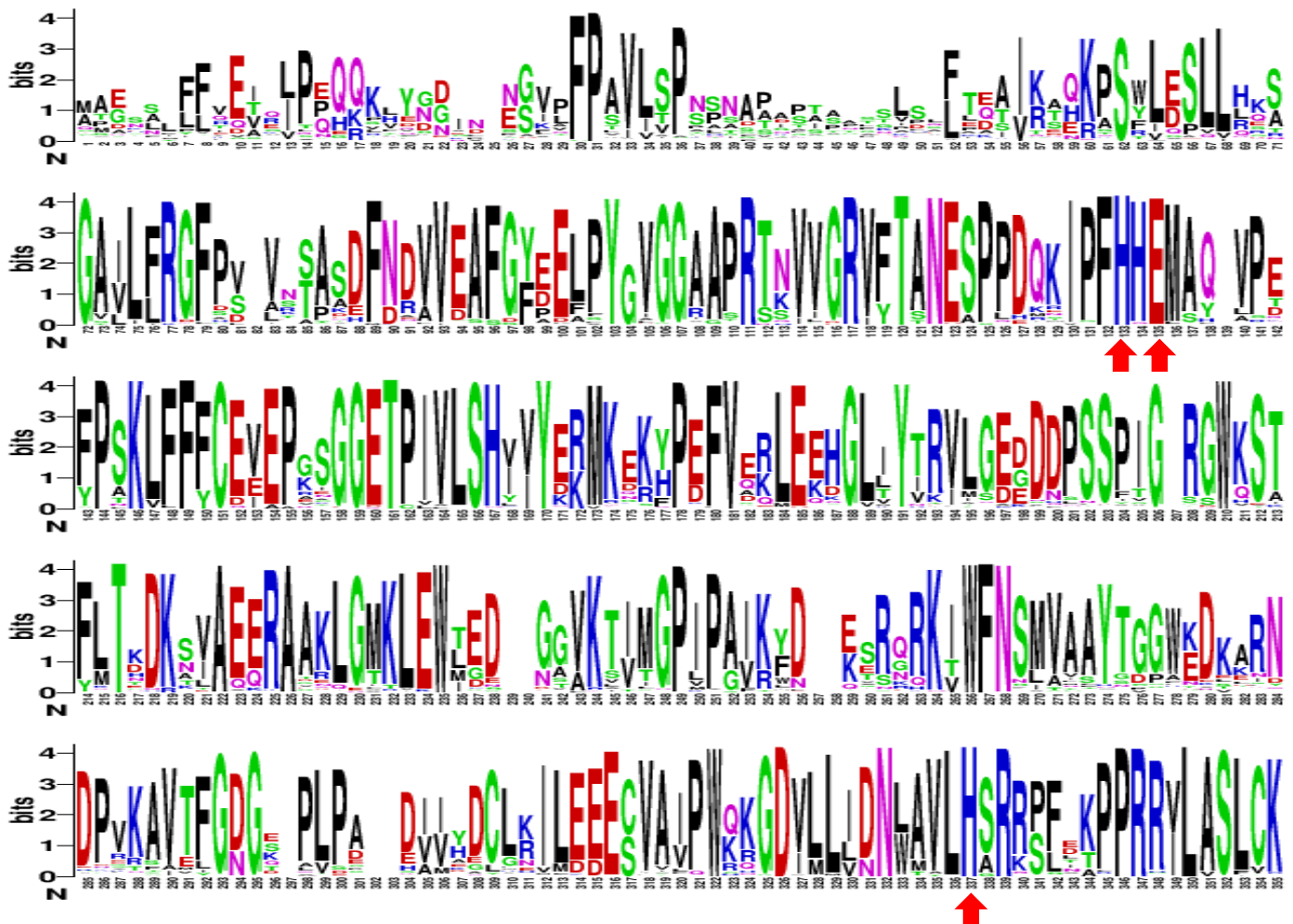


Figure 50 : « Sequence logo » des homologues végétaux de NP_188773.1. Les acides aminés catalytiques, strictement conservés, sont indiqués par une flèche rouge. Cet alignement a été réalisé au moyen du logiciel en ligne WEBLOGO (<https://weblogo.berkeley.edu/cgi>)

d. Etude de l'activité de la protéine NP_188773.1

Le gène *AT3G21360*, codant pour la protéine NP_188773.1, a été cloné dans le vecteur d'expression protéique pCDF-Duet et les bactéries BL21 ont été transformées avec cette construction. Les protéines bactériennes totales ont été extraites et l'activité de la protéine recombinante NP_188773.1 a été étudiée dans les mêmes conditions de réaction que celles utilisées afin de caractériser la BBD humaine (Lindstedt and Lindstedt 1970; Leung *et al.* 2010). Cette étude a pour but d'étudier son rôle possible dans la conversion de la γ -butyrobétaine en carnitine. L'activité de conversion de la γ -butyrobétaine en carnitine a été étudiée dans un mélange réactionnel contenant un tampon phosphate, de l'ascorbate de sodium, et du chlorure de potassium. Du sulfate de fer a été ajouté pour fournir l'ion Fe^{2+} requis par l'enzyme. Le cosubstrat de la BBD, du 2-oxoglutarate, a été ajouté, ainsi que 10, 100 et 1500 ng ml⁻¹ de γ -butyrobétaine. Une quantité variable de protéines bactériennes a été ajoutée : de 0 à 100 μ g ml⁻¹

¹. Le mélange a été incubé à température ambiante durant 16 heures ou 48 heures. A l'issue de cette incubation, la carnitine de l'échantillon a été analysée par LC-MS/MS. Cependant, dans toutes les conditions testées, **la protéine recombinante NP_188773.1 n'a permis de convertir la γ -butyrobétaine en carnitine**. Cette expérience n'a donc pas permis de confirmer l'implication de la protéine NP_188773.1 dans la conversion de la γ -butyrobétaine en carnitine.

2. Recherche de candidats CAT, COT et CPT chez les plantes

Chez les animaux et les levures, le rôle de la carnitine dans le transport des acides gras et de l'acétate est bien documenté. L'acétate et les acides gras sont estérifiés à la carnitine sous forme d'acyl(acétyl)carnitine (Bremer 1983), par les enzymes carnitine acyl(acétyl)transférase (Ramsay *et al.* 2001). Ces enzymes sont classées en trois catégories selon leur spécificité de substrats : les carnitine acétyltransférases (CAT), carnitine octanoyltransférases (COT), et carnitine palmitoyltransférases (CPT). Chez les animaux, les CAT, les COT et les CPT sont présentes notamment dans le peroxyosome, et la mitochondrie (Markwell *et al.* 1973; Clarke and Bieber 1981). Deux CPT existent : CPT1 sur la membrane externe de la mitochondrie et CPT2 sur la membrane interne. Chez les animaux et les levures, les carnitine acyl(acétyl)transférases sont impliquées dans le transport intracellulaire des acides gras et de l'acétate. C'est de cette manière que les acides gras sont transportés vers la matrice mitochondriale (Ramsay *et al.* 2001).

Chez les plantes, des activités carnitine acyl(acétyl)transférase ont été mesurées dans différents organites. Des activités CAT, COT et CPT ont été mesurées dans la mitochondrie (Wood *et al.* 1983; Burgess and Thomas 1986; Gerbling and Gerhardt 1988). Une activité CPT a été mesurée sur les membranes interne et externe de la mitochondrie, comme chez les animaux (Wood *et al.* 1984). Une carnitine acyltransférase a été purifiée à partir des mitochondries de l'hypocotyle de haricot mungo (Schwabedissen-Gerbling and Gerhardt 1995). De plus, de la carnitine estérifiée à l'acétate et aux acides gras a été quantifiée dans les tissus végétaux (Bourdin *et al.* 2007; Nguyen *et al.* 2016). Ces données suggèrent qu'il existe chez les plantes des enzymes capables de catalyser l'estérification de l'acétate et des acides gras en acétylcarnitine et acylcarnitine, respectivement.

Dans le cadre de cette thèse, une étude de la diversité des carnitine acyl(acétyl)transférases a été réalisée. Des candidats ont été recherchés par homologie de séquence chez l'ensemble des plantes. Enfin, une recherche d'homologues structuraux des carnitine acyl(acétyl)transférases

animales dans le protéome d'Arabidopsis a été réalisée en utilisant l'algorithme FORSA. L'outil HHPred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/>) permet de prédire la structure et la fonction d'une protéine à partir de sa séquence. Il a également été utilisé pour rechercher dans le protéome d'Arabidopsis des protéines dont la structure prédite serait homologue à celle des carnitine acyl(acétyl)transférases animales.

a. Etude de la diversité de la famille des carnitine acyl(acétyl)transférases

Les carnitine acyl(acétyl)transférases appartiennent à la famille PF00755, qui comprend aussi les choline acyltransférases. D'après la base de données pfam (<https://pfam.xfam.org/> (El-Gebali *et al.* 2018)), cette famille est présente chez tous les organismes vivants, à l'exception notable des plantes. Elle est identifiée chez les bactéries, les métazoaires, les champignons, les algues brunes, les oomycètes, et chez plusieurs groupes de protistes (bacillariophytes, ichthyosporea, cryptophytes, choanoflagellés, kinétoplastides, isochrysielles, prymnésiales, longamoebia, phytiales, et fonticula). Les deux clades les plus proches phylogénétiquement des plantes qui possèdent des carnitine acyl(acétyl)transférases sont les cryptophytes et les straménopiles (algues brunes).

Un alignement de séquences des carnitine acyl(acétyl)transférases couvrant l'ensemble du vivant a été réalisé en utilisant le logiciel Clustal (<https://www.rebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Larkin *et al.* 2007). Il inclut des CAT, COT et CPT dont la structure a été caractérisée d'un certain nombre de mammifères : le rat (*Rattus norvegicus*), la souris (*Mus musculus*), la vache (*Bos taurus*), le macaque (*Macaca fascicularis*) et l'Homme. Une séquence de la bactérie *Mycoplasma pneumoniae*, de la levure *S. cerevisiae*, de la cryptophyte *Guillardia theta* et de la straménopile *Ectocarpus silicosus* ont également été intégrées. L'alignement indique qu'au sein de la famille PF0075, les séquences bactériennes sont les plus éloignées des autres, partageant environ 20 % d'identité avec chacune des autres (Tableau 17 A). Au sein des eucaryotes, les séquences des carnitine acyl(acétyl)transférases partagent au moins 25 % d'identité, et au moins 40 % pour les carnitine acyl(acétyl)transférases d'une même catégorie. La CAT de l'homme et celle de la souris partagent 91 % d'identité (Tableau 17 B). Les deux isoformes CPT1 du cerveau et du foie de l'homme partagent 55 % d'identité. Les carnitine acyl(acétyl)transférases de catégories différentes partagent entre 27 et 31 % d'identité (Tableau 17 B). Ainsi, **la séquence des carnitine acyl(acétyl)transférases est conservée au sein des eucaryotes. Cela suggère que leurs structures sont elles aussi conservées.**

1		<i>Homo sapiens</i> CPT1 (foie) (2le3)	100,0				
2		<i>Homo sapiens</i> CPT1 (cerveau) (2m76)	54,9	100,0			
3		<i>Rattus norvegicus</i> CPT2 (2fw3)	27,3	27,9	100,0		
4		<i>Mus musculus</i> COT (1x17)	29,9	29,5	29,7	100,0	
5		<i>Mus musculus</i> CAT (1ndb)	30,7	29,6	31,6	33,2	100,0
6		<i>Homo sapiens</i> CAT (1nm8)	31,7	30,6	30,9	33,4	90,9
			1	2	3	4	5

b. Recherche de candidats par homologie de séquence

Une recherche d'homologues à partir des carnitine acyl(acétyl)transférases humaines et de levures a été réalisée dans la base de données NCBI chez l'ensemble des plantes. Ces analyses ont permis d'identifier la protéine XP 023925435.1, du protéome de *Q. suber*. Là encore, aucun homologue n'a pu être identifié par une recherche d'homologie de séquence par BLASTp chez l'ensemble des plantes avec cette protéine. En revanche, un grand nombre de protéines sont identifiées chez les champignons comme partageant jusqu'à 79 % d'identité avec la protéine XP 023902739.1. Il semblerait donc que, là encore, comme lors de la recherche d'une BBD, XP 023902739.1 ne soit pas une protéine de *Q. suber*, mais celle d'un champignon, en raison d'une contamination des séquences microbiennes.

Une analyse phylogénétique en maximum de vraisemblance a été réalisée avec un ensemble de CAT, COT, CPT1 et CPT2 d'animaux et de levures. Elle a été effectuée selon le modèle d'évolution des protéines LG (Le and Gascuel 2008), avec proportion de sites invariants et loi Gamma. Concernant les animaux, les CAT, COT, CPT1 et CPT2 de l'Homme et de la souris, ainsi qu'une CAT, une CPT1 et une CPT2 de *D. melanogaster*, ont été incluses. YAT2 et CACP, deux CAT de *S. cerevisiae* ont également été ajoutées ainsi qu'une troisième CAT putative. De manière à couvrir le maximum de diversité biologique, deux CAT putatives de la bactérie *Frankia alni* et du protiste *Trypanosoma brucei* ont été ajoutées, ainsi que la séquence de la protéine XP 023902739.1, supposée fongique.

La phylogénie révèle l'histoire évolutive des carnitine acyl(acétyl)transférases (Figure 51). Une première divergence a séparé d'une part le groupe comprenant les CPT2, les CAT putatives de *F. alni* et *T. brucei*, et YAT2 (Figure 51 en rouge), d'autre part le groupe des COT (Figure 51 en vert) et enfin, le groupe des CAT et des CPT1 (Figure 51 en violet et bleu, respectivement). La protéine XP 023902739.1 est incluse au sein du clade des CAT et CPT1, proche de la protéine CACP de *S. cerevisiae*. L'analyse phylogénétique supporte donc l'hypothèse que XP 023902739.1 est une carnitine acyl(acétyl)transférase fongique, et non animale. **Ainsi, les analyses par homologie de séquence n'ont malheureusement pas permis d'identifier des CACT potentielles chez Arabidopsis, ni chez l'ensemble des plantes.**

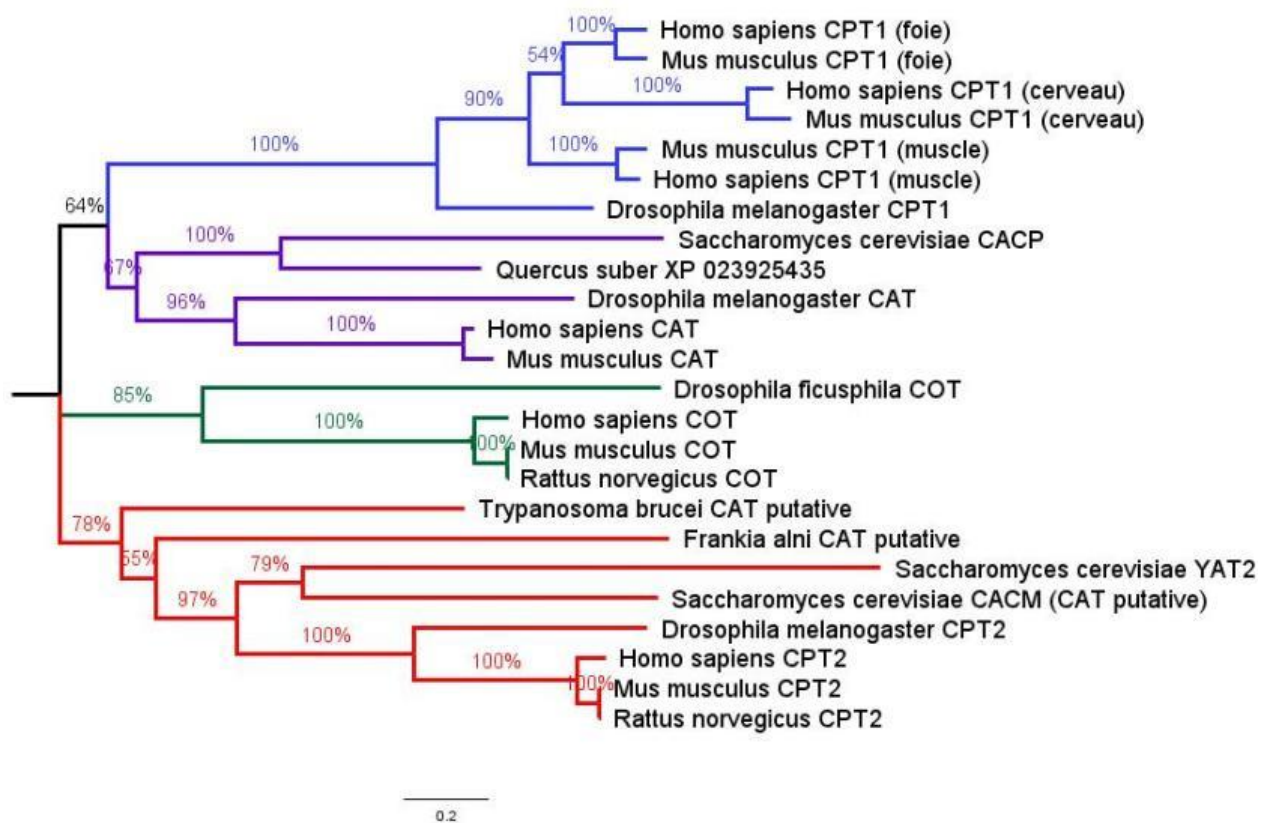


Figure 51 : Phylogénie en maximum de vraisemblance selon le modèle LG+I+G (Le et Gascuel, 2008 avec proportion de sites invariants et loi Gamma), des CAT, COT et CPT0 de l'ensemble des eucaryotes. Les pourcentages indiquent les valeurs de Bootstrap. Le groupe des CPT2 est représenté en rouge. Le groupe des COT est représenté en vert. Le groupe des CAT est représenté en violet. Le groupe des CPT1 est représenté en bleu. Abréviations : CAT : carnitine acétyltransférase. COT : carnitine octanoyltransférase. CPT : carnitine palmitoyltransférase. YAT : yeast acetyltransferase 2. L'analyse phylogénétique a été réalisée au moyen du logiciel Mega. Le modèle utilisé a été choisi grâce au logiciel JModelTest en utilisant le critère Akaike criterion. La figure a été réalisée à partir de cette analyse phylogénétique au moyen du logiciel FigTree.

c. Recherche de candidats par homologie de structure

Dans la littérature, les structures tridimensionnelles de six carnitine acyl(acétyl)transférases animales ont été élucidées et sont disponibles dans les bases de données. Les codes PDB de ces structures ont été utilisés pour les recherches d'homologie structurale. Ces protéines sont la CAT de la souris (référence PDB 1ndb) (Jogl and Tong 2003) et celle de l'Homme (référence PDB 1nm8) (Govindasamy *et al.* 2004), la COT de la souris (référence PDB 1xl7) (Jogl *et al.* 2005), la structure incomplète des isoformes du foie (Rao *et al.* 2011) et du cerveau (Samanta *et al.* 2014) de la CPT1 de l'Homme (références PDB 2le3 et 2m76), et enfin la CPT2 du rat (référence PDB 2fw3) (Rufer *et al.* 2006). Les structures de ces carnitine acyl(acétyl)transférases ont été superposées deux à deux en utilisant le logiciel PyMol. La similarité des structures a été déterminée en calculant le RMSD.

Le RMSD varie de 0,37 Å pour les CAT de souris et de l'Homme (Figure 52 A), à 1,5 Å pour la COT de souris et la CPTII du rat (Figure 52 D). Dans tous les cas, il traduit une homologie structurale élevée entre ces carnitine acyl(acétyl)transférases animales, même entre des carnitine acyl(acétyl)transférases partageant moins de 30 % d'identité de séquence (CPT2 et les autres). Ainsi, **au sein des carnitine acyl(acétyl)transférases, les structures sont très conservées y compris si elles appartiennent à une catégorie différente.** La présence chez les plantes de carnitine acyl(acétyl)transférases dont la structure est conservée par rapport à celle des animaux est donc probable. Une recherche de candidats par homologie structurale a donc été réalisée chez *Arabidopsis*.

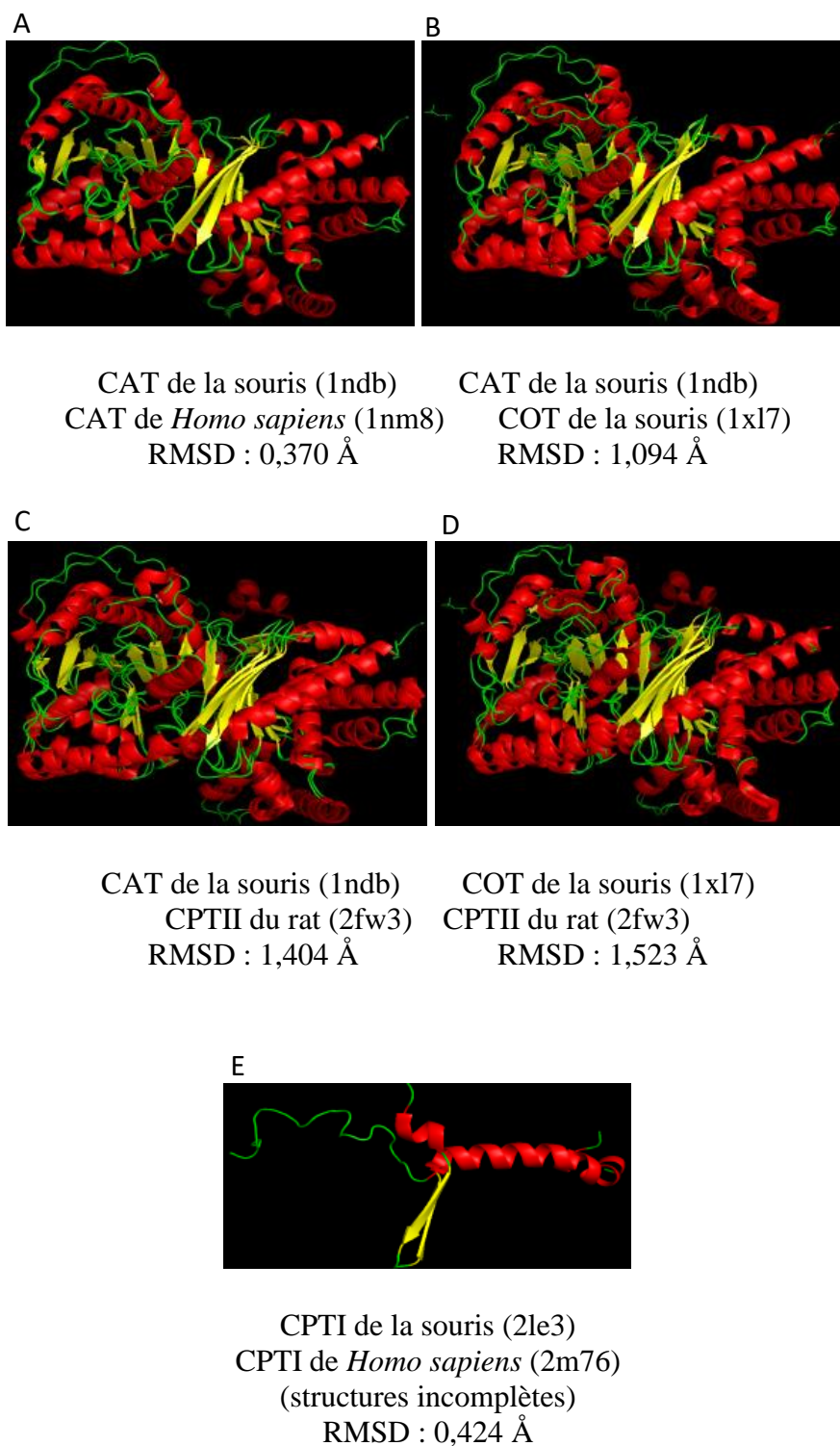


Figure 52 : Superpositions des structures des carnitine acyl(acétyl)transférases animales connues et qui ont été utilisées pour la recherche de candidats chez les plantes. A : superposition de la CAT de la souris avec la CAT de l'Homme. B : superposition de la CAT de la souris avec la COT de la souris. C : superposition de la CAT de la souris et de la CPTII du rat. D : superposition de la COT de la souris et de la CPTII du rat. E : superposition des zones régulatrices de deux isoformes de CPTI : celle du foie et celles du cerveau de l'Homme. Les superpositions ont été réalisées en utilisant le logiciel PyMol. Abréviations : CAT : carnitine acétyltransférase. COT : carnitine octanoyltransférase. CPT : carnitine palmitoyltransférase. Ces superpositions ont été réalisées au moyen du logiciel PyMol.

La recherche d'homologie structurale a été réalisée au moyen des algorithmes FORSA et HHPred. Les séquences compatibles avec chacune des six structures animales connues des carnitine acyl(acétyl)transférases ont été recherchées dans le protéome d'Arabidopsis. Aucune protéine ayant un score Z de proximité structurale significatif (plus de 7,5) n'a été trouvée chez Arabidopsis. Sept protéines avec un score Z supérieur à 7 sont identifiées (Tableau 18). Pour la plupart d'entre elles, l'alignement concerne moins de 100 résidus. Les données concernant la famille et la fonction de ces enzymes ne semblent pas compatibles avec une activité carnitine acyl(acétyl)transférase.

Tableau 18 : Protéines d'Arabidopsis identifiées par homologie structurale avec l'algorithme FORSA comme ayant les structures les plus proches des carnitine acyl(acétyl)transférases animales (Score $Z > 7$) en alignement local. Le score Z, la longueur de l'alignement et les pourcentages de similarité et d'identité de séquence calculés par FORSA sont indiqués. Les catégories des enzymes ont été recherchées dans la base de données TAIR. Abréviations : Hs : *Homo sapiens*. Mm : *Mus musculus*. Rn : *Rattus norvegicus*. CAT : carnitine acétyltransférase. COT : carnitine octanoyltransférase. CPT : carnitine palmitoyltransférase. ATP : adénosine triphosphate.

Protéine de référence	Identifiant de la protéine d'Arabidopsis	Score Z	Longueur de l'alignement	Similarité (%)	Identité (%)	Catégorie d'enzyme
HsCAT	AT3G23410,1	7,467	42	4,4	2,9	fatty alcohol oxidase
MmCAT	AT5G66310,1	7,086	437	16,5	10,1	ATP binding microtubule motor
MmCAT	AT1G05780,1	7,046	67	1,8	0,9	Vacuolar ATPase assembly integral membrane protein
HsCAT	AT5G62090,1	7,079	52	24,2	13,3	SEUSS-like 2
HsCAT	AT5G62090,2	7,079	52	24,2	13,3	SEUSS-like 2
RnCPT2	AT5G48740,1	7,122	269	19,7	11,8	Leucine-rich repeat protein kinase
RnCPT2	<u>AT2G13840,1</u>	7,087	57	21,3	13,3	Polymerase/histidinol phosphatase-like

La recherche utilisant l'algorithme HHPred n'a pas permis d'identifier chez Arabidopsis de protéine dont la structure prédite correspond à celle des carnitine acyl(acétyl)transférases animales. **Ainsi, aucun homologue structural des carnitine acyl(acétyl)transférases animales n'a pu être identifié chez Arabidopsis.**

3. Recherche de CACT potentielles chez les plantes

En complément des carnitine acyl(acétyl)transférases, l'activité CACT est requise pour le trafic intracellulaire des acylcarnitines. Chez les animaux, une CACT est présente au niveau de la membrane interne mitochondriale et des peroxysomes (Fraser and Zammit 1999). La structure protéique de la CACT du rat a été élucidée (Tonazzi *et al.* 2006). Elle est disponible dans la base de données PDB (référence PDB 1s50). Cette protéine est formée par 15 hélices α transmembranaires formant un canal antiporteur qui permet le transport de la carnitine libre vers l'espace intermembranaire et de l'acylcarnitine vers la matrice (Figure 53).

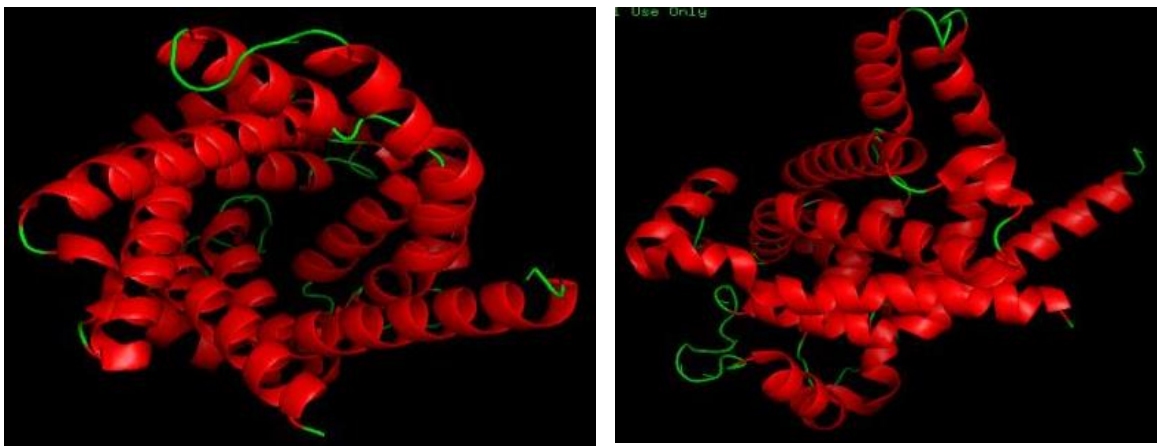


Figure 53 : Structure de la CACT du rat. (A) vue du canal. (B) vue latérale de la protéine. Les hélices alpha transmembranaires sont représentées en rouge. Les boucles sont représentées en vert. Ces images ont été réalisées au moyen du logiciel PyMol.

Chez les levures, la protéine CRC1 est une CACT localisée sur la membrane interne de la mitochondrie. Elle est en charge de l'importation des acylcarnitines dans la matrice mitochondriale (Palmieri *et al.* 1999). Chez les plantes, la protéine d'Arabidopsis A BOUT DE SOUFFLE (AtBOU), présente sur la membrane interne de la mitochondrie, partage 39 % d'identité avec la CACT humaine. De par cette importante homologie, AtBOU a été considérée comme une possible CACT (Lawand *et al.* 2002). Toutefois, elle a été identifiée depuis comme étant un transporteur impliqué dans la photorespiration et lié à l'activité de la glycine décarboxylase (Eisenhut *et al.* 2013), puis comme un transporteur de glutamate (Porcelli *et al.* 2018). Aucune CACT potentielle n'est donc proposée chez les plantes.

Tout d'abord, une étude de la diversité de la famille des CACT a été réalisée. Ensuite, une recherche d'homologues a été effectuée chez l'ensemble des plantes à partir des CACT humaines et de levures sur le site NCBI. Enfin, une recherche de protéines dont le repliement

serait compatible avec celui de la CACT du rat a été réalisée dans le protéome d'Arabidopsis en utilisant l'algorithme FORSA.

a. Etude de la diversité des CACT

Les CACT appartiennent à la famille PF00153 (Mitochondrial carrier), qui regroupe 67 000 transporteurs situés sur les membranes des plusieurs organites : les mitochondries, des peroxyosomes, des hydrogénosomes de certains champignons, et les amyloplastés des plantes. Elles sont impliquées dans le transport de diverses molécules au travers de la membrane mitochondriale, notamment le citrate, le phosphate, le 2-oxoglutarate, le glutamate, ou encore des acides aminés non protéinogènes comme l'ornithine. Cette famille est identifiée chez 590 espèces différentes dont 53 espèces de plantes, telles que Arabidopsis, le riz, le haricot vert (*Phaseolus vulgaris*) ainsi que des espèces des genres *Citrus* et *Solanum*. **En revanche, aucune enzyme de cette famille identifiée chez les plantes n'est connue à ce jour pour intervenir dans le transport de la carnitine.**

b. Recherche de candidats CACT par homologie de séquence

Une recherche par BLASTp avec les séquences peptidiques de la CACT humaine et de CRC1 a été réalisée chez l'ensemble des plantes. Cette recherche a permis d'identifier plusieurs homologues aux translocases humaine et fongique. La protéine XP 023902739.1, identifiée dans le protéome de *Q. suber* selon la base de données NCBI, est fortement homologue des translocases humaine et fongique (E value = 3.10^{-66}). Elle partage 44 % d'identité avec la CACT humaine. Des candidats (E value = 10^{-62} à 10^{-63} , partageant 42 % d'identité avec la CACT humaine et CRC1) ont notamment été identifiés chez la luzerne (*Medicago truncatula*) (protéine RHN41505), *Prunus avium* (protéine XP021817185), la mousse *P. patens* (protéine XP024359340), le trèfle *Trifolium subterraneum* (protéine GAU28959), la tomate (protéine XP004241964), et le pommier *M. domestica* (protéine RXH97025). Parmi les candidats figure également la protéine BOU d'Arabidopsis.

Toutes ces protéines sont annotées « mitochondrial carnitine acylcarnitine carrier-like proteins » dans NCBI. Cependant, l'identification de BOU comme seule protéine d'Arabidopsis parmi les homologues suggère que les candidats identifiés chez les autres espèces végétales pourraient ne pas être liés au transport de la carnitine. De plus, une recherche d'homologues de CRC1 dans le génome de la levure *S. cerevisiae* sur NCBI a permis d'identifier yeast mitochondrial carrier 1 (YMC1), un transporteur de glycine, comme étant le plus proche

paralogue de CRC1. Ces données suggèrent une grande proximité entre les CACT et les transporteurs de glycine.

Une analyse phylogénétique en maximum de vraisemblance des protéines ainsi identifiées chez les plantes, ainsi que des transporteurs de glycine et des CACT animales fongiques, a été réalisée. Elle a été effectuée selon le modèle d'évolution des protéines LG (Le et Gascuel, 2008) choisi par le logiciel JModelTest. Elle a pour but de déterminer si les protéines « CACT-like » de plantes sont proches des CACT animales et fongiques ou des transporteurs de glycine. L'analyse phylogénétique inclut les candidats CACT de *M. truncatula*, *T. subterraneum*, la tomate, *P. avium*, *M. domestica* et la mousse *P. patens*. Elle inclut également deux transporteurs d'Arabidopsis : BOU, et le transporteur d'arginine mitochondrial basic aminoacid carrier 2 (BAC2), qui partage 36,9 % d'identité avec BOU et les CACT caractérisées de l'Homme, la souris et le rat. Des transporteurs identifiés chez les levures ont été ajoutés : CRC1 et son paralogue, ainsi que le transporteur de glycine de *S. cerevisiae* YMC1, qui partage 29,1 % d'identité avec CRC1.

L'arbre phylogénétique montre une divergence initiale entre les CACT, incluant CRC1 et les CACT animales (Figure 54, en bleu); et un groupe incluant YMC1 et AtBOU (Figure 54, en rouge). Les séquences identifiées dans les bases de données comme étant des CACT putatives sont, comme AtBOU, plus proches du transporteur de glycine YMC1 que des CACT. Concernant les orthologues végétaux de YMC1, *P. patens* est en position basale, les séquences de rosacées (genres *Prunus* et *Malus*) sont regroupées et les séquences de fabacées (*Medicago* et *Trifolium*) sont regroupées également.

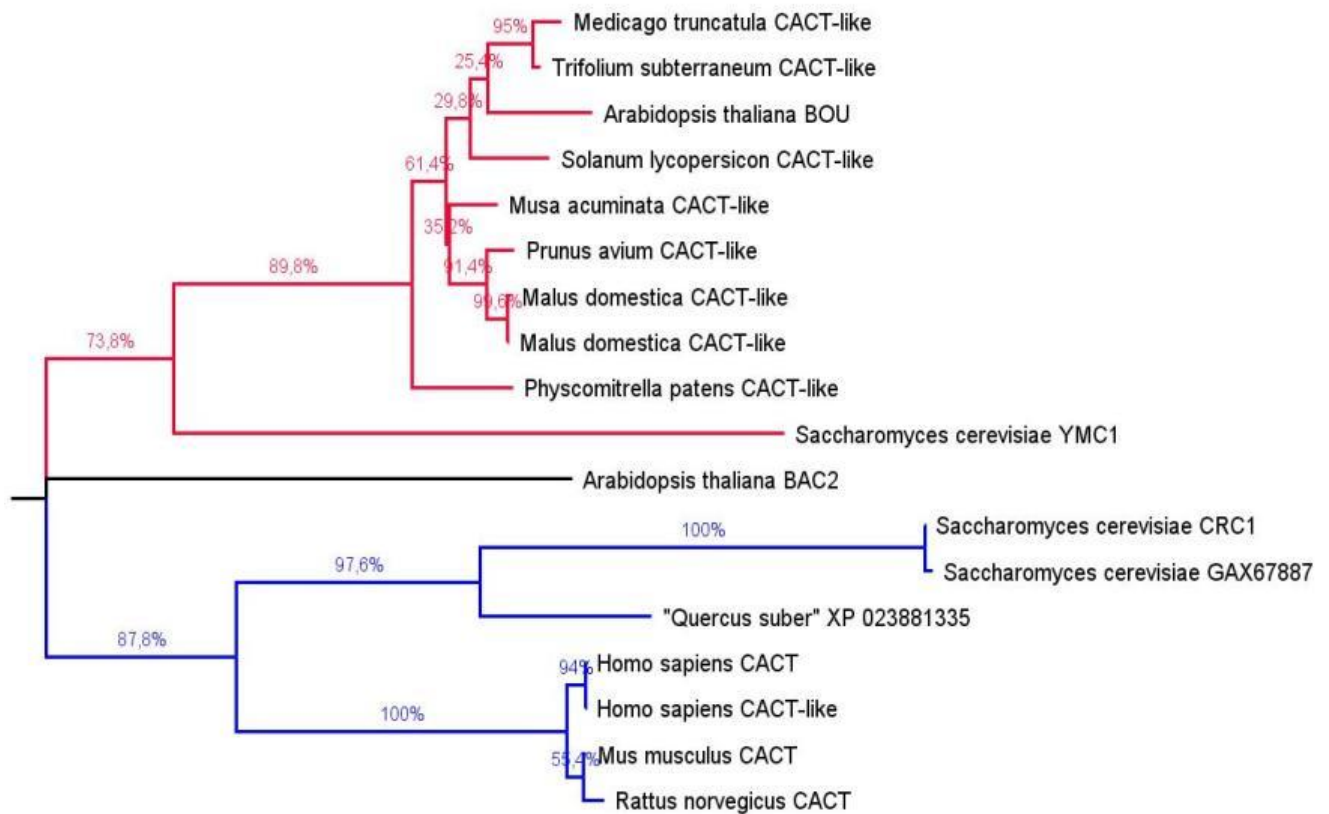


Figure 54 : Phylogénie en maximum de vraisemblance selon le modèle LG+I+G (Le et Gascuel, 2008, avec proportion de sites invariants et loi Gamma) des CACT et des transporteurs de glycine chez les eucaryotes, incluant les CACT végétales potentielles. Les pourcentages indiquent les valeurs de Bootstrap. Le clade des orthologues du transporteur de glycine YMC1 est représenté en rouge. Le clade des CACT est représenté en bleu. Abréviations : CACT : carnitine acylcarnitine translocase. BAC2 : Basic aminoacid carrier 2. YMC1: yeast mitochondrial carrier 1. L'analyse phylogénétique a été réalisée au moyen du logiciel Mega. Le modèle utilisé a été choisi grâce au logiciel JModelTest en utilisant le critère Akaike criterion. La figure a été réalisée à partir de cette analyse phylogénétique au moyen du logiciel FigTree.

La séquence XP 023881335.1 de *Q. suber* est classée dans le groupe des CACT (Figure 54). Cependant, aucun homologue de XP 023881335.1 n'a pu être identifié chez les plantes avec l'outil BLASTp. En revanche, chez les champignons, un grand nombre de protéines sont identifiées comme fortement homologues de la protéine XP 023881335.1. Les plus proches sont des protéines hypothétiques ou des protéines dénommées « mitochondrial carrier », dont une identifiée chez la levure *Hortaea werneckii* partageant jusqu'à 82 % d'identité de séquence avec elle (E value = 0,0). Il semblerait donc que XP 023881335.1 ne soit pas une protéine de *Q. suber*, mais là encore celle d'un champignon, comme lors de la recherche de candidats BBD et carnitine acyl(acétyl)transférases. Ainsi, **les recherches par homologie de séquence n'ont**

pas permis d'identifier des CACT potentielles chez Arabidopsis, ni chez l'ensemble des plantes.

c. Recherche de candidats CACT par homologie de structure

En utilisant les algorithmes FORSA et HHPred, aucun homologue structural potentiel de la CACT humaine n'a pu être identifié chez Arabidopsis. La recherche utilisant l'algorithme HHPred n'a pas non plus permis d'identifier chez Arabidopsis des protéines dont la structure prédite correspond à celle des CACT animales. **Ainsi, aucune protéine d'Arabidopsis, ni même dans l'ensemble des plantes, n'a pu être identifiée comme une CACT potentielle.**

4. Discussion et perspectives

a. Biosynthèse de la carnitine

Notre laboratoire a montré par le passé qu'Arabidopsis est capable de synthétiser la γ -butyrobétaine et la carnitine à partir de la TML (Rippa *et al.* 2012). Ce résultat a permis de suggérer que la voie de biosynthèse de la carnitine chez les plantes est similaire à celle des animaux, et requiert les mêmes activités enzymatiques. L'homologie de séquence n'a pas permis d'identifier des candidats pour les première et quatrième étapes de la voie de biosynthèse (Rippa *et al.* 2012). Dans le cadre de cette thèse, une approche nouvelle a été employée. Elle consiste à rechercher dans le protéome d'Arabidopsis des protéines dont la séquence est compatible avec la structure tridimensionnelle de la BBD humaine. La protéine NP_188773.1, a été identifiée dans le protéome d'Arabidopsis comme partageant une homologie de structure significative avec la BBD humaine. La triade de résidus responsables de la fixation du Fe^{2+} a été identifiée dans la séquence et leur structure se superpose parfaitement avec celles de la BBD humaine. Cependant, dans nos conditions expérimentales, la carnitine n'a pas pu être synthétisée à partir de la γ -butyrobétaine par la protéine NP_188773.1 *in vitro*.

Ainsi, bien qu'une activité de conversion de la γ -butyrobétaine en carnitine existe vraisemblablement chez les plantes, les analyses réalisées ici n'ont pas permis de confirmer que c'est le rôle de NP_188773.1. Cette protéine non caractérisée appartient à une famille regroupant de nombreuses enzymes utilisant le même cosubstrat. Elle pourrait avoir une activité proche, utilisant le 2-oxoglutarate comme cosubstrat, sans être capable de prendre en charge la γ -butyrobétaine.

Chez l'Homme, la première étape et la quatrième étape de la voie de biosynthèse de la carnitine sont similaires. La TMLD et la BBD appartiennent à la même famille de protéines: PF02668. Les deux chélatent un ion Fe^{2+} et utilisent le 2-oxoglutarate comme cosubstrat. Il est donc probable que chez les plantes, la première et la quatrième étape de la biosynthèse de la carnitine soient catalysées par des enzymes proches. Il est également possible qu'elles soient catalysées par une seule enzyme, ayant une spécificité de substrat large. Néanmoins, le fait que NP_188773.1 partage une identité de séquence avec la TMLD plus élevée qu'avec la BBD humaine, et son incapacité à synthétiser la carnitine suggère qu'elle pourrait être impliquée dans la première étape de la biosynthèse de la carnitine. Elle serait responsable de la conversion de la TML en HTML, plutôt que de la γ -butyrobétaïne en carnitine.

Concernant la capacité de NP_188773.1 à convertir la γ -butyrobétaïne en carnitine, l'étude a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que la BBD humaine, hormis la température (25°C dans cette étude, contre 37°C pour la BBD humaine (Leung *et al.* 2010)). Il est possible que ces conditions ne soient pas optimales pour le fonctionnement de NP_188773.1. Une étude *in vivo* pourrait donc être envisagée pour vérifier l'hypothèse de son intervention dans la synthèse de la carnitine. Plusieurs mutants de substitution et d'insertion sont disponibles pour ce gène. En particulier, la banque de mutants SALK comporte une lignée, SALK_007445, ayant une insertion T-DNA dans le troisième exon du gène *AT3G21360*. Ce mutant n'a pas été caractérisé. Il serait intéressant de doser la γ -butyrobétaïne et la carnitine par LC-MS/MS dans les tissus de ce mutant afin de déterminer s'il est affecté dans la conversion de la γ -butyrobétaïne en carnitine, ou éventuellement dans la conversion indirecte de la TMLD en γ -butyrobétaïne.

b. Enzymes impliquées dans le transport des acides gras et de l'acétate *via* la carnitine

Les enzymes carnitine acyl(acétyl)transférases sont identifiées dans l'ensemble du vivant, excepté chez les plantes. Cette famille est présente chez les bactéries et les eucaryotes. Elle est donc apparue avant la divergence entre bactéries et eucaryotes. Chez les animaux, la structure de ces enzymes est bien conservée, y compris entre des carnitine acyl(acétyl)transférases ayant une spécificité de substrat différente. Cela suggère que des enzymes ayant la même activité chez les plantes pourraient aussi avoir une structure similaire. Pourtant, la recherche par homologie structurale n'a pas permis d'identifier de carnitine acyl(acétyl)transférase potentielle dans le protéome d'*Arabidopsis*.

Pourtant, des activités CAT, COT et CPT ont été mesurées dans la mitochondrie (Wood *et al.* 1983; Burgess and Thomas 1986; Gerbling and Gerhardt 1988). Une activité CPT a été mesurée sur les membranes interne et externe de la mitochondrie, comme chez les animaux (Wood *et al.* 1984). De plus une carnitine acyltransférase a été purifiée à partir des mitochondries de l'hypocotyle de haricot mungo (Schwabedissen-Gerbling and Gerhardt 1995). Ainsi, malgré cette absence d'homologie structurale, des enzymes ayant une activité carnitine acyl(acétyl)transférase existent nécessairement chez les plantes. Il est possible que chez les plantes, les enzymes de cette famille aient évolué plus rapidement que dans les autres lignées, jusqu'à perdre l'homologie de séquence et de structure avec les autres, tout en conservant leur activité. Cette absence d'homologie de structure chez les plantes pourrait aussi résulter d'une perte de cette famille, qui aurait été compensée par la spécialisation d'autres enzymes.

Chez les plantes, l'identification d'activités CPT sur la membrane interne et la membrane externe des mitochondries (Wood *et al.* 1984) suggère la présence d'un système de transport des acides gras similaires à celui des animaux, impliquant une CACT. Pourtant, aucune protéine d'*Arabidopsis* ayant une structure prédite compatible à celle de la CACT humaine n'a pu être identifiée. Les CACT appartiennent à une famille de transporteurs mitochondriaux impliqués dans le transport de plusieurs types de molécules, dont des acides aminés. En particulier, il existe une forte homologie entre les CACT et les transporteurs de glycine.

La protéine d'*Arabidopsis* BOU, qui a été identifiée dans une première étude comme étant une CACT potentielle, s'est finalement révélé être un transporteur mitochondrial impliqué dans la photorespiration et lié à l'activité de la glycine décarboxylase (Eisenhut *et al.* 2013). Une étude récente, utilisant la caractérisation *in vitro* et la complémentation de levure, a par ailleurs permis d'identifier AtBOU comme étant un transporteur de glutamate (Porcelli *et al.* 2018). Par homologie de séquence, des enzymes annotées « CACT-like » sont identifiées par BLAST chez plusieurs espèces de plantes. L'analyse phylogénétique réalisée ici a néanmoins révélé que la totalité des enzymes de plantes annotées « CACT like » disponibles dans la base de données NCBI sont vraisemblablement des orthologues de AtBOU et du transporteur de glycine fongique YMC1. Une implication de ces enzymes dans le transport de carnitine et de l'acylcarnitine n'est cependant pas exclue. Mais l'incapacité de AtBOU à complémenter une souche de levure perte de fonction pour la CACT (Bourdin 2007), contrairement à la CACT humaine (Ijlst *et al.* 2001), ne plaide pas en ce sens.

D'après ces différentes analyses, les informations disponibles dans la base de données NCBI concernant le protéome de *Q. suber* semblent inexacts. Une BBD potentielle, une carnitine

acyl(acétyl)transférase potentielle et une CACT potentielle ont été identifiées par homologie de séquence. Cependant les analyses de ces séquences ont révélé que ce sont probablement des séquences fongiques. Il est donc très probable qu'une partie du protéome de *Q. suber* disponible dans les bases de données, qui a été obtenu par séquençage d'ADN par la méthode shotgun, corresponde en réalité à celui d'un champignon.

IV. Conclusion générale et perspectives

L'intervention des enzymes ALDH10 dans la physiologie de la plante, et notamment dans la voie de biosynthèse de la carnitine, a été étudiée au cours de ce travail de thèse. L'activité des deux ALDH10 d'*Arabidopsis* a été caractérisée *in vitro* sur plusieurs aminoaldéhydes. Cette étude a permis de connaître leurs spécificités de substrats et de formuler des hypothèses concernant les processus physiologiques dans lesquels elles pourraient être impliquées. La création et la caractérisation d'un double mutant *KO8-2 badh*, perte de fonction pour AtALDH10A8 et AtALDH10A9, a permis d'approfondir ces hypothèses et de proposer des rôles biologiques pour les AtALDH10.

Cette étude a montré que les enzymes AtALDH10A8 et AtALDH10A9 sont capables d'oxyder des substrats variés : l'APAL, l'ABAL, le TMAPAL, le TMABAL, le GBAL, la BAL et le DMABAL. A la différence des ALDH10 spécifiques de la BAL, dites « BADH vraies », elles oxydent efficacement les aminoaldéhydes linéaires, comme l'APAL et l'ABAL, mais sont faiblement actives sur la BAL. Cette préférence peut être expliquée par la présence d'un tryptophane en position 288 dans leur séquence. Ainsi, AtALDH10A8 et AtALDH10A9 n'interviennent pas ou peu dans la production de glycine bêtaïne chez *Arabidopsis*.

Plusieurs données suggèrent une redondance entre les deux AtALDH10. Tout d'abord, les deux gènes sont exprimés de manière ubiquitaire, sans être spécifiques d'un organe ou d'un stade de développement. Ensuite, la spécificité de substrat des deux AtALDH10 est proche. Enfin, la plupart des phénotypes observés chez le double mutant *KO8-2 badh* ne sont pas observés chez les simples mutants *KO8-2* et *badh*. Ainsi, la perte de fonction pour l'une des deux AtALDH10 est donc compensée par l'autre isoenzyme. Aucune perte de fonction d'un gène par rapport à l'autre n'entraîne de surexpression de l'autre transcrite. La compensation ne s'effectue donc pas au niveau transcriptionnel.

La principale différence entre les deux isoformes concerne le fait que AtALDH10A8 est plus active sur les concentrations faibles d'APAL et de TMABAL, et AtALDH10A9 sur les concentrations plus élevées. Il est donc possible que les deux isoenzymes soient spécialisées en fonction de la concentration des substrats dans leurs compartiments cellulaires respectifs : le plaste et le peroxyosome (Missihoun *et al.* 2011).

D'après les analyses réalisées dans le cadre de cette thèse, les AtALDH10 pourraient être impliquées dans la résistance au stress salin. Leur capacité à oxyder l'ABAL *in vitro* suggère qu'elles interviennent dans la biosynthèse de GABA, qui est un osmoprotectant (Shelp *et al.* 1999). Cependant, si *KO8-2 badh* montre une sensibilité accrue au stress salin, celle-ci ne résulte pas d'un défaut d'accumulation de GABA. En effet, *KO8-2 badh* conserve une capacité résiduelle à prendre en charge l'ABAL, et la teneur en GABA dans les plantes stressées est comparable à celle des plantes sauvages. D'autre part, le GABA semble être synthétisé majoritairement partir de glutamate *via* la glutamate décarboxylase (Kinnersley and Turano 2000), donc indépendamment des ALDH10.

La capacité des AtALDH10 à prendre en charge l'APAL et l'ABAL suggère qu'elles interviennent dans la dégradation des polyamines. Ceux-ci sont convertis en APAL et ABAL, deux composés qui pourraient être toxiques, dans le peroxyosome et vraisemblablement dans le plaste. Il est possible que AtALDH10A8 et AtALDH10A9 interviennent dans la détoxification de ces aminoaldéhydes, en les convertissant en leurs acides aminés correspondants. *KO8-2 badh* pourrait donc être sujet à une accumulation d'aminaldéhydes toxiques, ce qui pourrait aussi expliquer l'échec de fécondation ou de maturation de la graine, et donc le nombre significativement réduit de graines viables. Les polyamines peuvent s'accumuler lors d'un stress salin (Galston *et al.* 1997). La moindre capacité du mutant *KO8-2 badh* à détoxifier l'ABAL et l'APAL pourrait donc également expliquer sa sensibilité accrue au stress salin.

Chez *KO8-2 badh*, ces effets délétères peuvent avoir des conséquences favorables pour les graines qui parviennent à maturité. Leur richesse en protéines et, dans une moindre mesure, en lipides, pourrait être liée à leur nombre moins important dans les siliques, qui permettrait à la plante mère de leur fournir une quantité de réserves accrue. Le dosage de l'eicosénoate indique que la quantité initiale de lipides de réserve est ensuite consommée plus rapidement durant la première semaine de développement chez *KO8-2 badh*. Cela peut expliquer la croissance plus rapide des plantules, due à une synthèse plastidiale accrue, et la formation plus rapide des cotylédons et des premières paires de feuilles. Une étude approfondie de l'embryogenèse chez *KO8-2 badh* pourrait être envisagée pour connaître les raisons de cette accumulation plus importante de réserves carbonées. Des dosages de lipides et de protéines dans des embryons prélevés à différents stades de l'embryogenèse pourraient être réalisés.

Les expériences réalisées ici confirment l'homologie fonctionnelle entre les ALDH10 et les TMABADH humaines et fongiques. La capacité de AtALDH10A8 et AtALDH10A9 à prendre en charge efficacement le TMABAL, et la teneur réduite en γ -butyrobétaïne chez les mutants

KO8-2, *badh* et *KO8-2 badh* montrent que les AtALDH10 sont impliquées dans la conversion du TMABAL en γ -butyrobétaine *in planta*.

Il faut noter que *KO8-2 badh* conserve une capacité résiduelle à oxyder le TMABAL et à produire de la γ -butyrobétaine. Cette activité pourrait être expliquée par l'intervention des enzymes ALDH7 dans l'oxydation du TMABAL (Končítíková *et al.* 2015). De plus, même si le phénotype de *KO8-2 badh*, plus marqué que celui des simples mutants, suggère une perte de fonction pour les deux isoenzymes, il est possible qu'il ne soit pas perte de fonction totale pour AtALDH10A9. En effet, le T-DNA du mutant *badh* est localisé dans un intron. De plus des transcrits correspondants à la partie C-terminale de la protéine ont été détectés. Il n'est pas exclu que des enzymes tronquées AtALDH10A9 puissent être produites, et responsables de la teneur résiduelle en γ -butyrobétaine. Il serait intéressant d'identifier, par une approche de RT-PCR quantitative ciblant différents endroits du transcrit, à quel endroit cette protéine pourrait être tronquée. La production d'une protéine AtALDH10A9 recombinante incomplète, et l'analyse de sa capacité à oxyder le TMABAL, pourrait également être envisagée pour confirmer cette hypothèse.

KO8-2 badh semble être le seul mutant à teneur réduite en γ -butyrobétaine décrit à ce jour chez les plantes. Bien qu'aucun rôle biologique de la γ -butyrobétaine autre que la biosynthèse de la carnitine n'est rapporté dans la littérature à notre connaissance, la caractérisation de *KO8-2 badh* permet de proposer un lien entre la γ -butyrobétaine et plusieurs processus physiologiques. Ces résultats rejoignent un travail précédemment réalisé au sein de notre laboratoire, qui avait analysé de manière globale l'effet de la γ -butyrobétaine exogène sur la modulation de l'expression des gènes sur des plantules d'*Arabidopsis*, au moyen de puces à ADN. Ce travail avait montré que la γ -butyrobétaine module l'expression de quelques dizaines de gènes aux fonctions diverses.

Ainsi, la sensibilité de *KO8-2 badh* au stress salin suggère que la γ -butyrobétaine pourrait intervenir dans la réponse au stress osmotique. En soutien à cette hypothèse, la γ -butyrobétaine peut moduler l'expression de plusieurs gènes codant des protéines impliquées dans la réponse au stress hydrique, comme early responsive to dehydration 7 (ERD7), des lipoxgénases, ou encore des facteurs de transcription des superfamilles myeloblastosis (MYB) et essential recombination function (ERF) (Charrier 2011). Cependant, la baisse de la teneur en γ -butyrobétaine dans les tissus en réponse au stress salin ne plaide pas en ce sens.

Le développement plus rapide et la teneur en lipides moins élevée dans les plantules de *KO8-2 badh* suggèrent que la γ -butyrobétaine pourrait également jouer un rôle dans le développement et le métabolisme lipidique. Or, la γ -butyrobétaine exogène induit une sous-expression de gènes impliqués dans les processus développementaux, comme une late embryogenesis abundant (*LEA*). Elle module aussi l'expression de gènes impliqués dans la modulation du système rédox, notamment des dismutases et les catalases, qui pourraient influencer sur la disponibilité du NAD^+ au cours du développement précoce.

Enfin, la hampe florale plus haute et le nombre plus important de hampes florales secondaires chez *KO8-2 badh* suggère que la γ -butyrobétaine puisse intervenir dans les voies de signalisation en lien avec l'architecture de la plante. En soutien à cette hypothèse, la γ -butyrobétaine exogène module l'expression d'une gibbérelline 2-bêta-dioxygénase, associée à la signalisation hormonale. Elle module aussi l'expression d'un gène codant une basic helix-loop-helix, impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

L'analyse du rôle de la γ -butyrobétaine chez *Arabidopsis* doit être approfondie. Dans ce but, la lignée *Arabidopsis* surexprimant les deux *AtALDH10* (Missihoun et al. 2015) pourrait être un outil de choix. La quantification de la γ -butyrobétaine chez ces plantes pourrait permettre de connaître l'effet de la surexpression des *AtALDH10* sur la teneur en γ -butyrobétaine. La quantification de carnitine et de γ -butyrobétaine en réponse au stress salin pourrait aussi être envisagée, pour confirmer l'accumulation de carnitine chez ce mutant (Missihoun et al. 2015) et éventuellement détecter une consommation de γ -butyrobétaine concomitante. Il est néanmoins possible que cette consommation ne soit pas détectable, la γ -butyrobétaine étant présente chez les plantes en quantité très supérieure à celle de carnitine (Rippa et al. 2012, Chapitre B).

La teneur résiduelle en γ -butyrobétaine chez *KO8-2 badh* semble suffisante pour permettre la synthèse d'une quantité de carnitine comparable au sauvage. En effet, la γ -butyrobétaine est présente chez les plantes en quantité très supérieure à la carnitine. La moindre disponibilité de la γ -butyrobétaine pourrait aussi entraîner une régulation positive de l'enzyme en charge de la conversion de la γ -butyrobétaine en carnitine. Enfin, il est possible que la carnitine puisse être synthétisée chez les plantes d'une autre manière que par conversion directe de la γ -butyrobétaine.

A l'heure actuelle, un mutant d'*Arabidopsis* incapable de synthétiser la carnitine n'a pas été rapporté. Une démarche de génétique classique pourrait être menée pour approfondir l'étude du rôle de la carnitine chez les plantes. L'identification et la caractérisation d'un mutant affecté dans synthèse de carnitine, sous réserve de sa viabilité, serait cruciale. Par exemple, un mutant affecté dans la dernière étape de la voie de biosynthèse de la carnitine pourrait être identifié par une teneur réduite en carnitine et une teneur accrue en γ -butyrobétaine. De plus, puisque la carnitine et la γ -butyrobétaine pourraient être liées au développement de la plantule et/ou aux voies de signalisation hormonale, il pourrait être envisagé de doser ces composés chez des mutants affectés dans la signalisation hormonale ou le développement.

La voie de biosynthèse de la carnitine chez les plantes partage des similitudes avec celle des animaux et des levures. Jusqu'ici, bien qu'une activité de conversion de la γ -butyrobétaine en carnitine existe vraisemblablement chez les plantes, les recherches par homologie de séquence n'avaient pas permis d'identifier de candidats pour cette activité (Rippa *et al.* 2012; Zhao 2014). Dans le cadre de cette thèse, une recherche exhaustive utilisant la même approche n'a pas permis d'identifier de candidats chez l'ensemble des plantes. En revanche, une recherche utilisant l'homologie structurale a permis d'identifier la protéine NP_188773.1 d'*Arabidopsis* comme étant proche de la BBD humaine, qui catalyse la conversion de la γ -butyrobétaine en carnitine. Cette protéine non caractérisée appartient à une famille regroupant de nombreuses enzymes utilisant le fer II comme cofacteur et le 2-oxoglutarate comme cosubstrat. Cependant, les analyses réalisées ici n'ont pas permis de confirmer l'implication de NP_188773.1 dans la conversion de la γ -butyrobétaine en carnitine. Sa proximité avec la TMLD humaine suggère qu'elle puisse être impliquée dans la première étape de la voie de biosynthèse de la carnitine. La capacité de cette protéine à convertir la TML en HTML pourrait donc être étudiée *in vitro*, par expérience de complémentation de la lignée de levure *C. albicans* CKS105a *tmdlΔ/Δ*, perte de fonction pour la TMLD (Strijbis *et al.* 2009).

Des enzymes responsables des activités CAT, COT et CPT existent chez les plantes, puisqu'elles ont été mesurées dans la mitochondrie, le plaste et le peroxyosome (Wood *et al.* 1983; Burgess and Thomas 1986; Gerbling and Gerhardt 1988) et qu'une carnitine acyltransférase mitochondriale a été purifiée (Schwabedissen-Gerbling and Gerhardt 1995). De plus, la mesure d'une activité CPT sur la membrane interne et sur la membrane externe de la mitochondrie, comme chez les animaux (Wood *et al.* 1984), suggère la présence chez les plantes

d'un système de transport des acides gras de type navette carnitine. Ce système pourrait utiliser également un transporteur de type CACT.

Pourtant, la recherche par homologie structurale réalisée ici n'a pas permis d'identifier de carnitine acyl(acétyl)transférase potentielle, ni de CACT potentielle, dans le protéome d'Arabidopsis. Les protéines proches des CACT humaines et fongiques, identifiées chez plusieurs espèces de plantes, sont vraisemblablement des homologues du transporteur BOU d'Arabidopsis. Si l'implication de ces protéines dans le transport de carnitine ne peut être exclu pour autant, l'incapacité de AtBOU à compléter une souche de levure perte de fonction pour la protéine CRC1 (Bourdin 2007) ne plaide pas en ce sens.

Ainsi, les enzymes responsables de l'activité de transport des acides gras ou de l'acétate par la carnitine n'ont pas pu être identifiées chez les plantes. Un système utilisant l'estérification à la carnitine existe vraisemblablement, mais ne partage pas d'homologie de séquence et de structures avec son équivalent animal et fongique. Il est possible que ces enzymes aient été perdues chez les plantes au cours de l'évolution, et remplacées par d'autres enzymes. Il est possible également que ces enzymes aient fortement divergé chez les plantes, au point de perdre l'identité de séquence et de structure. Dans les deux cas, l'identification chez les plantes d'un tel système paraît ardue.

Ici encore, une démarche de génétique classique pourrait peut-être permettre d'identifier des enzymes impliquées dans le transport des acides gras et de l'acétate par la carnitine, sous réserve que ces mutants soient viables. L'identification et l'étude de mutants dépourvus d'activité CAT, COT ou CPT dans le plaste, le peroxyosome ou la mitochondrie pourrait apporter des éléments de réponse quant au rôle précis de la carnitine dans la physiologie de la plante.

Références

- 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', *Biochemical Journal*, 269(1), 25–29.
- Angeles-Núñez, J.G., Tiessen, A. (2011) 'Mutation of the transcription factor LEAFY COTYLEDON 2 alters the chemical composition of Arabidopsis seeds, decreasing oil and protein content, while maintaining high levels of starch and sucrose in mature seeds', *Journal of Plant Physiology*, 168(16), 1891–1900.
- Angelidis, A.S., Smith, G.M. (2003a) 'Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium', *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7492–7498.
- Angelidis, A.S., Smith, G.M. (2003b) 'Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnitine by *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress', *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1013–1022.
- Angelidis, A.S., Smith, L.T., Hoffman, L.M., Smith, G.M. (2002) 'Identification of OpuC as a chill-activated and osmotically activated carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*', *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2644–2650.
- Arakawa, K., Katayama, M., Takabe, T. (1990) 'Levels of betaine and betaine aldehyde dehydrogenase activity in the green leaves, and etiolated leaves and roots of barley', *Plant cell Physiology*, 31(6), 797–803.
- Arduini, A., Mancinelli, G., Radatti, G.L., Dottori, S., Molajoni, F., Ramsay, R.R. (1992) 'Role of carnitine and carnitine palmitoyltransferase as integral components of the pathway for membrane phospholipid fatty acid turnover in intact human erythrocyte', *Journal of Biological Chemistry*, 267(18), 12673–12681.
- Ariffin, A., Mcneil, P.H., Cooke, R.J., Wood, C., Thomas, D.R. (1982) 'Carnitine content of greening barley leaves', *Phytochemistry*, 21(6), 1431–1432.
- Ashraf, M., Foolad, M.R. (2007) 'Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance', *Environmental and Experimental Botany*, 59, 206–216.
- Augustyniak, A., Skrzydlewska, E. (2009) 'L-carnitine in the lipid and protein protection against ethanol-induced oxidative stress', *Alcohol*, 43, 217–223.
- Bae, M.S., Cho, E.J., Choi, E.Y., Park, O.K. (2003) 'Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome

- and its response to cold stress', *The Plant Journal*, 36, 652–663.
- Bates, P.D., Stymne, S., Ohlrogge, J. (2013) 'Biochemical pathways in seed oil synthesis', *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 358–364.
- Baud, S., Boutin, J., Miquel, M., Lepiniec, L., Rochat, C. (2002) 'An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS', *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 151–160.
- Benning, C. (2009) 'Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells', *Annual review of cell and developmental biology*, 25, 71–91.
- Benvenga, S., Amato, A., Calvani, M., Trimarchi, F. (2004) 'Effects of carnitine on thyroid hormone action', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1033, 158–167.
- Bitto, E., Bingman, C.A., Aceti, D.J., Allard, S.T.M., Wesenberg, G.E., Wrobel, R.L., Frederick, R.O., Vojtik, F.C., Sreenath, H., Jeon, W.B., Newman, C.S., Primm, J., Sussman, M.R., Fox, B.G., Markley, J.L., Phillips, G.N. (2005) 'The structure at 2.4 Å resolution of the protein from gene locus At3g21360, a putative FeII/2-oxo-glutarate-dependent enzyme from *Arabidopsis thaliana*', *Acta Crystallographica*, 61(5), 469–472.
- Bouché, N., Fromm, H. (2004) 'GABA in plants: Just a metabolite?', *Trends in Plant Science*, 9(3), 110–115.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J. (1999) 'Polyamines and environmental challenges: recent development', *Plant Science*, 140(2), 103–125.
- 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 Technologie de Compiègne, Compiègne, France.
- Bourdin, B., Adenier, H., Perrin, Y. (2007) 'Carnitine is associated with fatty acid metabolism in plants', *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(12), 926–931.
- Bradford, M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.
- Bremer, J. (1983) 'Carnitine-metabolism and functions', *Physiological reviews*, 63(4), 1420–1480.
- Brocker, C., Vasiliou, M., Carpenter, S., Carpenter, C., Zhang, Y., Kotchoni, S., Wood, A., Kirch, H.-H., Kopečný, D., Nebert, D., Vasiliou, V., Wang, X. (2013) 'Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics', *Planta*, 237(1), 189–210.

- Brouquisse, R., Hanson, A.D., Rhodes, D., Yocum, C.F., Weigel, P. (2008) 'Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma', *Plant physiology*, 90(1), 322–329.
- Burgess, N., Thomas, D.R. (1986) 'Carnitine acetyltransferase in pea cotyledon mitochondria', *Planta*, 167(1), 58–65.
- Calabrese, V., Ravagna, A., Colombrita, C., Scapagnini, G., Guagliano, E., Calvani, M., Butterfield, D.A., Giuffrida Stella, A.M. (2005) 'Acetylcarnitine induces heme oxygenase in rat astrocytes and protects against oxidative stress: Involvement of the transcription factor Nrf2', *Journal of Neuroscience Research*, 79(4), 509–521.
- Canovas, M., Bernal, V., Sevilla, A., Iborra, J.L. (2007) 'Salt stress effects on the central and carnitine metabolisms of *Escherichia coli*', *Biotechnology and Bioengineering*, 96(4), 722–737.
- Cassin-Ross, G., Hu, J. (2014) 'Systematic phenotypic screen of Arabidopsis peroxisomal mutants identifies proteins involved in β -oxidation.', *Plant physiology*, 166(3), 1546–59.
- Cederblad, G., Lindstedt, S. (1972) 'A method is described for the determination of carnitine in picomole range', *Clinica Chimica Acta.*, 37, 235–243.
- Charrier, A. (2011) *Etude de l'implication de la carnitine dans la tolérance aux stress abiotiques chez Arabidopsis thaliana*, Thèse de l'Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France.
- Charrier, A., Rippa, S., Yu, A., Nguyen, P.J., Renou, J.P., Perrin, Y. (2012) 'The effect of carnitine on Arabidopsis development and recovery in salt stress conditions', *Planta*, 235, 123–135.
- Chen, S., Yang, Y., Shi, W., Ji, Q., He, F., Zhang, Z., Cheng, Z., Liu, X., Xu, M. (2008) 'Badh2, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance.', *The Plant cell*, 20(7), 1850–61.
- Chen, T.H.H., Murata, N. (2008) 'Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants', *Trends in Plant Science*, 13(9), 499–505.
- Choi, S.J., Oh, D.H., Song, C.S., Roy, A.K., Chatterjee, B. (1995) 'Molecular cloning and sequence analysis of the rat liver carnitine octanoyltransferase cDNA, its natural gene and the gene promoter', *Biochimica et biophysica acta*, 1259, 261–270.
- Clarke, P.R.H., Bieber, L.L. (1981) 'Isolation and purification of mitochondrial carnitine octanoyltransferase activities from beef heart', *Journal of Biological Chemistry*, 256(19), 9861–9868.
- Console, L., Giangregorio, N., Indiveri, C., Tonazzi, A. (2014) 'Carnitine/acylcarnitine translocase

- and carnitine palmitoyltransferase 2 form a complex in the inner mitochondrial membrane', *Mol Cell Biochem*, 2, 307–314.
- Constantin-Teodosiu, D., Cederblad, G., Hultman, E. (1992) 'PDC activity and acetyl group accumulation in skeletal muscle during isometric contraction', *Journal of Applied Physiology*, 74(4), 2403–2047.
- Cotton, L.M., Rodriguez, C.M., Suzuki, K., Orgebin-Crist, M.C., Hinton, B.T. (2010) 'Organic cation/carnitine transporter, OCTN2, transcriptional activity is regulated by osmotic stress in epididymal cells', *Molecular Reproduction and Development*, 77, 114–125.
- Crocoll, C., Halkier, B.A., Burow, M. (2016) 'Analysis and quantification of glucosinolates', *Current Protocols in Plant Biology*, 1, 385–409.
- Cronin, C.N. (1997) 'cDNA cloning, recombinant expression, and site-directed mutagenesis of bovine liver carnitine octanoyltransferase. Arg505 binds the carboxylate group of carnitine', *European Journal of Biochemistry*, 247, 1029–1037.
- Derrick, J.P., Ramsay, R.R. (1989) 'L-carnitine acyltransferase in intact peroxisomes is inhibited by malonyl-CoA', *The Biochemical journal*, 262, 801–806.
- Deuschle, K., Dietmar, F., Forlani, G., Stransky, H., Biehl, A., Leister, D., Van der Graaff, E., Kunze, R., Frommer, W.B. (2004) 'The role of D1-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation', *The Plant cell*, 16, 3413–3425.
- Deuschle, K., Funck, D., Hellmann, H., Däschner, K., Binder, S., Frommer, W.B. (2001) 'A nuclear gene encoding mitochondrial Δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity', *Plant Journal*, 27(4), 345–355.
- Díaz-Sánchez, Á.G., González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C., Rudiño-Piñera, E., Montiel, C., Martínez-Castilla, L.P., Muñoz-Clares, R. a (2012) 'Amino acid residues critical for the specificity for betaine aldehyde of the plant ALDH10 isoenzyme involved in the synthesis of glycine betaine.', *Plant physiology*, 158(4), 1570–82.
- Dickinson, H., Rodriguez-Enriquez, J., Grant-Downton, R. (2018) 'Pollen Germination and pollen tube growth of *Arabidopsis thaliana*: in vitro and semi in vivo methods', *Bio-Protocol*, 8(16), 1–15.
- Dunkley, T.P.J., Hester, S., Shadforth, I.P., Runions, J., Weimar, T., Hanton, S.L., Griffin, J.L., Bessant, C., Brandizzi, F., Hawes, C., Watson, R.B., Dupree, P., Lilley, K.S. (2006) 'Mapping the *Arabidopsis* organelle proteome', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6518–6523.

- Eastmond, P.J., Graham, I.A. (2001) 'Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds', *Trends in Plant Science*, 6(2), 72–77.
- Eisenhut, M., Planchais, S., Cabassa, C., Guivarc'H, A., Justin, A.M., Taconnat, L., Renou, J.P., Linka, M., Gagneul, D., Timm, S., Bauwe, H., Carol, P., Weber, A.P.M. (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', *Plant Journal*, 73, 836–849.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S.R., Luciani, A., Potter, S.C., Qureshi, M., Richardson, L.J., Salazar, G.A., Smart, A., Sonnhammer, E.L.L., Hirsh, L., Paladin, L., Piovesan, D., Tosatto, S.C.E., Finn, R.D. (2018) 'The Pfam protein families database in 2019', *Nucleic Acids Research*, 47(October 2018), 427–432.
- Elgersma, Y., van Roermund, C.W.T., Wanders, R.J.A., Tabak, H.F. (1995) 'Peroxisomal and mitochondrial carnitine acetyltransferases of *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a single gene', *The EMBO Journal*, 14(14), 3472–3479.
- Engemann, C., Ellsner, T., Kleber, H.P. (2001) 'Biotransformation of crotonobetaine to L(-)-carnitine in *Proteus* sp', *Archives of Microbiology*, 175(5), 353–359.
- Enomoto, A., Wempe, M.F., Tsuchida, H., Shin, H.J., Cha, S.H., Anzai, N., Goto, A., Sakamoto, A., Niwas, T., Kanai, Y., Anders, M.W., Endou, H. (2002) 'Molecular identification of a novel carnitine transporter specific to human testis', *Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 36262–36271.
- Evans, P.T., Malmberg, R.L. (1989) 'Do polyamines have roles in plant development?', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, (40), 235–269.
- Fan, W., Zhang, M., Zhang, H., Zhang, P. (2012) 'Improved tolerance to various abiotic stresses in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas*) expressing spinach betaine aldehyde dehydrogenase.', *PloS one*, 7(5), e37344.
- Farrell, S.O., Bieber, L.L. (1983) 'Carnitine octanoyltransferase of mouse liver peroxisomes: properties and effect of hypolipidemic drugs', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 222(1), 123–132.
- Ferdinandusse, S., Mulders, J., Jlst, L.I., Denis, S., Dacremont, G., Waterham, H.R., Wanders, R.J. (1999) 'Molecular cloning and expression of human carnitine octanoyltransferase: evidence for its role in the peroxisomal beta-oxidation of branched-chain fatty acids', *Biochemical and biophysical research communications*, 263, 213–218.
- Fitzgerald, T.L., Waters, D.L.E., Henry, R.J. (2009) 'Betaine aldehyde dehydrogenase in plants.'

- Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 11(2), 119–30.
- Footitt, S., Dietrich, D., Fait, A., Fernie, A.R., Holdsworth, M.J., Baker, A., Theodoulou, F.L. (2007) 'The COMATOSE ATP-binding cassette transporter is required for full fertility in Arabidopsis', *Plant Physiology*, 144, 1467–1480.
- Fraenkel, G. (1951a) 'Isolation procedures and certain properties of vitamin BT', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 34(2), 468–477.
- Fraenkel, G. (1951b) 'Effect and distribution of vitamin BT', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 34, 457–467.
- Fraenkel, G. (1953) 'Studies on the distribution of vitamin BT (carnitine)', *The Biological Bulletin*, 104, 359–371.
- Franken, J., Kroppenstedt, S., Swiegers, J.H., Bauer, F.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, V.A. (1999) 'Submitochondrial and subcellular distributions of the carnitine-acylcarnitine carrier', *FEBS Letters*, 445, 41–44.
- Frömmel, J., Šebela, M., Demo, G., Lenobel, R., Pospíšil, T., Soral, M., Kopečný, D. (2014) 'N-acyl- ω -aminoaldehydes are efficient substrates of plant aminoaldehyde dehydrogenases', *Amino Acids*, 47(1), 175–187.
- Frömmel, J., Soral, M., Tylichová, M., Kopečný, D., Demo, G., Wimmerová, M., Šebela, M. (2012) 'Plant aminoaldehyde dehydrogenases oxidize a wide range of nitrogenous heterocyclic aldehydes', *Amino Acids*, 43(3), 1189–1202.
- Fu, Y., Wei, D., Dong, H., He, Y., Cui, Y., Mei, J., Wan, H., Li, J., Snowdon, R., Friedt, W., Li, X., Qian, W. (2015) 'Comparative quantitative trait loci for silique length and seed weight in *Brassica napus*', *Scientific Reports*, 5, 1–9.
- Fujiwara, T., Hori, K., Ozaki, K., Yokota, Y., Mitsuya, S., Ichianagi, T., Hattori, T., Takabe, T. (2008) 'Enzymatic characterization of peroxisomal and cytosolic betaine aldehyde dehydrogenases in barley.', *Physiologia plantarum*, 134(1), 22–30.
- Galston, A.W., Kaur-Sawhney, R., Altabella, T., Tiburcio, A.F. (1997) 'Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress', *Botanica Acta*, 110(3), 197–207.
- Gerbling, H., Gerhardt, B. (1988) 'Carnitine-acyltransferase activity of mitochondria from mung-bean hypocotyls', *Planta*, 174, 90–93.

- Gómez-Amores, L., Mate, A., Miguel-Carrasco, J.L., Jiménez, L., Jos, Á., Cameán, A.M., Revilla, E., Santa-María, C., Vázquez, C.M. (2007) 'L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 533–540.
- González-Segura, L., Rudiño-Piñera, E., Muñoz-Clares, R. a, Horjales, E. (2009) 'The crystal structure of a ternary complex of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* Provides new insight into the reaction mechanism and shows a novel binding mode of the 2'-phosphate of NADP⁺ and a novel cation binding site', *Journal of molecular biology*, 385(2), 542–57.
- Gooding, J.M., Shayeghi, M., Saggerson, E.D. (2004) 'Membrane transport of fatty acylcarnitine and free L-carnitine by rat liver microsomes', *European Journal of Biochemistry*, 271(5), 954–961.
- Gould, S.J., Keller, G.A., Subramani, S. (1988) 'Identification of peroxisomal targeting signals located at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins', *The Journal of cell biology*, 107(3), 897–905.
- Govindasamy, L., Kukar, T., Lian, W., Pedersen, B., Gu, Y., Agbandje-McKenna, M., Jin, S., McKenna, R., Wu, D. (2004) 'Structural and mutational characterization of L-carnitine binding to human carnitine acetyltransferase', *Journal of Structural Biology*, 146(3), 416–424.
- Graham, I.A. (2008) 'Seed storage oil mobilization', *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 115–142.
- Gruez, A., Roig-Zamboni, V., Grisel, S., Salomoni, A., Valencia, C., Campanacci, V., Tegoni, M., Cambillau, C. (2004) 'Crystal structure and kinetics identify *Escherichia coli* YdcW gene product as a medium-chain aldehyde dehydrogenase', *Journal of molecular biology*, 343(1), 29–41.
- Guerrero, F.D., Jones, J.T., Mullet, J.E. (1990) 'Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes', *Plant Molecular Biology*, 15(1), 11–26.
- Gülçin, I. (2006) 'Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine', *Life Sciences*, 78(8), 803–811.
- Gulewitsch, W., Krimberg, R. (1905) 'Zur kenntnis der extraktivstoffe der muskeln. 2.Mitteilung über das carnitin', *Physiol. Chem.*, 45, 326–330.
- Hanson, A.D., Rathinasabapathi, B., Rivoal, J., Burnet, M., Dillon, M.O., Gage, D.A. (1994) 'Osmoprotective compounds in the Plumbaginaceae: a natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), 306–310.
- Hanson, A.D., Wyse, R. (1982) 'Biosynthesis, translocation, and accumulation of betaine in sugar beet

- and its progenitors in relation to salinity', *Plant physiology*, 70, 1191–1198.
- Harmeyer, J. (2002) 'The physiological role of L-carnitine', *Lohmann Information*, (27), 1–8.
- Ben Hassine, A., Ghanem, M.E., Bouzid, S., Lutts, S. (2008) 'An inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus* L. differ in their ability to accumulate proline and glycinebetaine in response to salinity and water stress.', *Journal of experimental botany*, 59(6), 1315–26.
- Hettema, E.H., van Roermund, C.W.T., Distel, B., van den Berg, M., Vilela, C., Rodrigues-Pousada, C., Wanders, R.J.A., Tabak, H.F. (1996) 'The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*', *The EMBO journal*, 15(15), 3813–22.
- Hibino, T., Meng, Y.L., Kawamitsu, Y., Uehara, N., Matsuda, N., Tanaka, Y., Ishikawa, H., Baba, S., Takabe, T., Wada, K., Ishii, T., Takabe, T. (2001) 'Molecular cloning and functional characterization of two kinds of betaine-aldehyde dehydrogenase in betaine-accumulating mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh', *Plant Molecular Biology*, 45(3), 353–363.
- Hibino, T., Waditee, R., Araki, E., Ishikawa, H., Aoki, K., Tanaka, Y., Takabe, T. (2002) 'Functional characterization of choline monooxygenase, an enzyme for betaine synthesis in plants.', *The Journal of biological chemistry*, 277(44), 41352–60.
- Huck, N., Moore, J.M., Federer, M., Grossniklaus, U. (2003) 'The Arabidopsis mutant *feronia* disrupts the female gametophytic control of pollen tube reception', *Development*, 130(10), 2149–2159.
- Hulse, J.D., Ellis, S.R., Henderson, L.M. (1978) ' β -hydroxylation of trimethyllysine by an α -ketoglutarate-dependant mitochondrial dioxygenase', *The Journal of biological chemistry*, 253(5), 1654–1659.
- Hulse, J.D., Henderson, L.M. (1980) 'Purification of 4-N-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase from beef liver', *The Journal of Biological Chemistry*, 255(3), 1146–1151.
- Ishitani, M., Nakamura, T., Han, S.Y., Takabe, T. (1995) 'Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid', *Plant Molecular Biology*, 27(2), 307–315.
- Ito, J., Batth, T.S., Petzold, C.J., Redding-johanson, A.M., Mukhopadhyay, A., Verboom, R., Meyer, E.H., Millar, A.H., Heazlewood, J.L. (2016) 'Analysis of the Arabidopsis cytosolic proteome highlights subcellular partitioning of central plant metabolism', 1571–1582.
- Jia, G.-X., Zhu, Z.-Q., Chang, F.-Q., Li, Y.-X. (2002) 'Transformation of tomato with the BADH gene from *Atriplex* improves salt tolerance', *Plant Cell Reports*, 21(2), 141–146.

- Jiang, W.-B., Huang, H.-Y., Hu, Y.-W., Zhu, S.-W., Wang, Z.-Y., Lin, W.-H. (2013) 'Brassinosteroid regulates seed size and shape in Arabidopsis', *Plant Physiology*, 162(4), 1965–1977.
- Jogl, G., Hsiao, Y.S., Tong, L. (2005) 'Crystal structure of mouse carnitine octanoyltransferase and molecular determinants of substrate selectivity', *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), 738–744.
- Jogl, G., Tong, L. (2003) 'Crystal structure of carnitine acetyltransferase and implications for the catalytic mechanism and fatty acid transport', *Cell*, 112(1), 113–122.
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jornvall, H., Eklund, H. (1998) 'Structure of betine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution', *Protein Science*, 7, 2106–2117.
- Johnston, M.L., Luethy, M.H., Miernyk, J.A., Randall, D.D. (1997) 'Cloning and molecular analyses of the Arabidopsis thaliana plastid pyruvate dehydrogenase subunits', *Biochimica et biophysica acta*, 1321, 200–206.
- Joshi, T., Xu, D. (2007) 'Quantitative assessment of relationship between sequence similarity and function similarity', *BMC Genomics*, 8, 1–10.
- Kalaiselvi, T., Panneerselvam, C. (1998) 'Effect of L-carnitine on the status of lipid peroxidation and antioxidants in aging rats', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 9, 575–581.
- Kasschau, M.R., Skisak, C.M., Cook, J.P., Mills, W.R. (1984) 'β-Alanine metabolism and high salinity stress in the sea anemone, *Bunodosoma cavernata*', *Journal of Comparative Physiology B*, 154(2), 181–186.
- Kaup, M.T., Froese, C.D., Thompson, J.E. (2002) 'A Role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence', *Plant Physiology*, 129(4), 1616–1626.
- Kikonyogo, A., Pietruszko, R. (1996) 'Aldehyde dehydrogenase from adult human brain that dehydrogenates γ-aminobutyraldehyde: purification, characterization, cloning and distribution', *Biochemical Journal*, 316(1), 317–324.
- Kim, D., Shibato, J., Agrawal, G.K., Fujihara, S., Iwahashi, H., Kim, D.H., Shim, I.-S., Rakwal, R. (2007) 'Gene transcription in the leaves of rice undergoing salt-induced morphological changes (*Oryza sativa* L.)', *Molecules and cells*, 24(1), 45–59.
- Kim, S., Yamaoka, Y., Ono, H., Kim, H., Shim, D., Maeshima, M., Martinoia, E., Cahoon, E.B., Nishida, I., Lee, Y. (2013) 'AtABCA9 transporter supplies fatty acids for lipid synthesis to the endoplasmic reticulum', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(2), 773–778.
- Kind, T., Liu, K.-H., Lee, D.Y., DeFelice, B., Meissen, J.K., Fiehn, O. (2013) 'LipidBlast in silico tandem mass spectrometry database for lipid identification.', *Nature Methods*, 10(8), 755–758.

- Kinnersley, A.M., Turano, F.J. (2000) 'Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress', *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19(6), 479–509.
- Kirch, H.-H., Bartels, D., Wei, Y., Schnable, P.S., Wood, A.J. (2004) 'The ALDH gene superfamily of Arabidopsis.', *Trends in plant science*, 9(8), 371–7.
- Kishitani, S., Takanami, T., Suzuki, M., Oikawa, M., Yokoi, S., Ishitani, M., Alvarez-Nakase, M., Takabe, T. (2000) 'Compatibility of glycinebetaine in rice plants: evaluation using transgenic rice plants with a gene for peroxisomal betaine aldehyde dehydrogenase from barley', *Plant, Cell and Environment*, 23(1), 107–114.
- Kleffmann, T., Russenberger, D., Von Zychlinski, A., Christopher, W., Sjölander, K., Gruissem, W., Baginsky, S. (2004) 'The Arabidopsis thaliana chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions', *Current Biology*, 14(5), 354–362.
- Koelmel, J.P., Kroeger, N.M., Ulmer, C.Z., Bowden, J.A., Patterson, R.E., Cochran, J.A., Beecher, C.W.W., Garrett, T.J., Yost, R.A. (2017) 'LipidMatch: an automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data', *BMC Bioinformatics*, 18(1), 1–11.
- Končítíková, R., Vigouroux, A., Kopečná, M., Andree, T., Bartoš, J., Šebela, M., Moréra, S., Kopečný, D. (2015) 'Role and structural characterization of plant aldehyde dehydrogenases from family 2 and family 7', *Biochemical Journal*, 468(1), 109–123.
- Kopečná, M., Vigouroux, A., Vilím, J., Končítíková, R., Briozzo, P., Hájková, E., Jašková, L., von Schwanzenberg, K., Šebela, M., Moréra, S., Kopečný, D. (2017) 'The ALDH21 gene found in lower plants and some vascular plants codes for a NADP⁺-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase', *Plant Journal*, 92(2), 229–243.
- Kopečný, D., Končítíková, R., Tylichová, M., Vigouroux, A., Moskalíková, H., Sural, M., Šebela, M., Moréra, S. (2013) 'Plant ALDH10 family: identifying critical residues for substrate specificity and trapping a thiohemiacetal intermediate.', *The Journal of biological chemistry*, 288(13), 9491–507.
- Kopečný, D., Tylichová, M., Snegaroff, J., Popelková, H., Šebela, M. (2011) 'Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of ω -aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases', *The FEBS journal*, 278(17), 3130–9.
- Küfner, I., Koch, W. (2008) 'Stress regulated members of the plant organic cation transporter family are localized to the vacuolar membrane', *BMC Research Notes*, 1, 1–10.
- Kumar, S. (2004) 'Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance', *Plant physiology*, 136(1), 2843–2854.

- Kutscher, F. (1905) 'Über liebigs fleischextrakt', *Zeitschr. f. Untersuchung.*, 582–584.
- Lacey, D.J., Hills, M.J. (1999) 'Purification and analysis of a low density membrane fraction from developing seeds of *Brassica napus*', *Phytochemistry*, 50, 915–917.
- Ladyman, J.A.R., Hitz, W.D., Hanson, A.D. (1980) 'Translocation and metabolism of Gmycine Betaine by barley plants in Relation to Water Stress', *Planta*, 150, 191–196.
- Larkin, M. a, Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P. a, McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007) 'Clustal W and Clustal X version 2.0.', *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(21), 2947–8.
- Lawand, S., Dorne, A., 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', *The Plant cell*, 14, 2161–2173.
- Le, S.Q., Gascuel, O. (2008) 'An improved general amino acid replacement matrix', *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1307–1320.
- Legaria, J., Rajsbaum, R., Munoz-Clares, R.A., Villegas-Sepulveda, N., Simpson, J. (1998) 'Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth . Expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid', *Gene*, 218(1998), 69–76.
- Lelandais-Brière, C., Jovanovic, M., Torres, G.A.M., 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', *The Plant Journal*, 51, 154–164.
- Leung, I.K.H., Krojer, T.J., Kochan, G.T., Henry, L., Von Delft, F., Claridge, T.D.W., Oppermann, U., McDonough, M.A., Schofield, C.J. (2010) 'Structural and mechanistic studies on γ -butyrobetaine hydroxylase', *Chemistry and Biology*, 17(12), 1316–1324.
- Levin, E.J., Kondrashov, D.A., Wesenberg, G.E., Philips, G.N. (2007) 'Ensemble refinement of protein crystal structures: validation and application', *Structure*, 15(9), 1040–1052.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M.X., Arondel, V., Bates, P.D., Baud, S., Bird, D., DeBono, A., Durrett, T.P., Franke, R.B., Graham, I.A., Katayama, K., Kelly, A.A., Larson, T., Markham, J.E., Miquel, M., Molina, I., Nishida, I., Rowland, O., Samuels, L., Schmid, K.M., Wada, H., Welti, R., Xu, C., Zallot, R., Ohlrogge, J. (2013) 'Acyl-Lipid metabolism', *The Arabidopsis Book*, 11, e0161.
- Li, N., Gügel, I.L., Giavalisco, P., Zeisler, V., Schreiber, L., Soll, J., Philippar, K. (2015) 'FAX1, a novel membrane protein mediating plastid fatty acid export', *PLoS Biology*, 13(2), 1–37.

- Li, Q., Gao, X., Yu, X., Wang, X., An, L. (2003) 'Molecular cloning and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda liaotungensis* and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco', 1431–1436.
- Li, Y., Rosso, M.G., Viehoveer, P., Weisshaar, B. (2007) 'GABI-kat simplesearch: An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database with detailed information for confirmed insertions', *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL. 1), 874–878.
- Liang, Z., Zhang, D.-P., Shen, Y., Pan, Q., Wang, X., Zhang, L.-Y., Gao, X., Chen, S., Li, M., Lu, Y. (2004) 'Abscisic acid is involved in the water stress-induced betaine accumulation in pear leaves', *Plant and Cell Physiology*, 45(6), 742–750.
- Lindstedt, G., Lindstedt, S. (1970) 'Cofactor requirements of gamma-butyrobetaine hydroxylase from Rat Liver', *The Journal of biological chemistry*, 245(16), 4178–4186.
- Liu, L., Zhang, D.M., Wang, M.X., Fan, C.Y., Zhou, F., Wang, S.J., Kong, L.D. (2015) 'The adverse effects of long-term L-carnitine supplementation on liver and kidney function in rats', *Human and Experimental Toxicology*, 34(11), 1148–1161.
- Longo, N., Frigeni, M., Pasquali, M. (2016) 'Carnitine transport and fatty acid oxidation', *Biochimica et biophysica acta*, 1863(10), 2422–35.
- Mahajan, S., De Brevern, A.G., Sanejouand, Y.H., Srinivasan, N., Offmann, B. (2015) 'Use of a structural alphabet to find compatible folds for amino acid sequences', *Protein Science*, 24(1), 145–153.
- Manoli, I., De Martino, M.U., Kino, T., Alesci, S. (2004) 'Modulatory effects of L-carnitine on glucocorticoid receptor activity', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1033, 147–157.
- Marchitti, S.A., Brocker, C., Stagos, D., Vasilis, V. (2008) 'Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily', *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4(6), 697–720.
- Markwell, M.A.K., McGroarty, E.J., Bieber, L.L., Tolbert, N.E. (1973) 'The subcellular distribution of carnitine acyltransferases in mammalian liver and kidney', *The Journal of Biological Chemistry*, 248(10), 3426–3432.
- Marquis, N.R., Fritz, I.B. (1964) 'Enzymological determination of free carnitine concentrations in rat tissues.', *Journal of lipid research*, 5(9), 184–187.
- Masterson, C., Wood, C. (2000a) 'Pea chloroplast carnitine acetyltransferase', *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 267(1438), 1–6.
- Masterson, C., Wood, C. (2000b) 'Mitochondrial β -oxidation of fatty acids in higher plants', *Physiologia Plantarum*, 109(Schulz 1991), 217–224.

- Masterson, C., Wood, C. (2009) 'Influence of mitochondrial β -oxidation on early pea seedling development', *New Phytologist*, 181, 832–842.
- Masterson, C., Wood, C., Thomas, D.R. (1990) 'L-acetylcarnitine, a substrate for chloroplast fatty acid synthesis', *Plant, Cell and Environment*, 13, 755–765.
- McLaren, I., Wood, C., Jalil, M.N.H., Yong, B.C.S., Thomas, D.R. (1985) 'Carnitine acyltransferases in chloroplasts of *Pisum sativum* L.', *Planta*, 163, 197–200.
- Mcneil, P.H., Thomas, D.R. (1975) 'Carnitine content of pea seedling cotyledons', *Phytochemistry*, 14, 2335–2336.
- Meloni, D.A., Gulotta, M.R., Martínez, C.A., Oliva, M.A. (2004) 'The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in *Prosopis alba*', *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 16(1), 39–46.
- Missihoun, T.D., Kotchoni, S.O., Bartels, D. (2018) 'Aldehyde Dehydrogenases Function in the Homeostasis of Pyridine Nucleotides in *Arabidopsis thaliana*', *Scientific Reports*, 8(1), 4–11.
- Missihoun, T.D., Schmitz, J., Klug, R., Kirch, H.-H., Bartels, D. (2011) 'Betaine aldehyde dehydrogenase genes from *Arabidopsis* with different sub-cellular localization affect stress responses', *Planta*, 233(2), 369–82.
- Missihoun, T.D., Willèe, E., Guegan, J.P., Berardocco, S., Shafiq, M.R., Bouchereau, A., Bartels, D. (2015) 'Overexpression of ALDH10A8 and ALDH10A9 genes provides insight into their role in glycine betaine synthesis and affects primary metabolism in *Arabidopsis thaliana*', *Plant and Cell Physiology*, 56(9), 1798–1807.
- Mitsuya, S., Yokota, Y., Fujiwara, T., Mori, N., Takabe, T. (2009) 'OsBADH1 is possibly involved in acetaldehyde oxidation in rice plant peroxisomes', *FEBS Letters*, 583(22), 3625–3629.
- Moghaieb, R.E.A., Tanaka, N., Saneoka, H., Hussein, H.A., Yousef, S.S., Ewada, M.A.-F., Aly, M.A.M., Fujita, K. (2000) 'Expression of betaine aldehyde dehydrogenase gene in transgenic tomato hairy roots leads to the accumulation of glycine betaine and contributes to the maintenance of the osmotic potential under salt stress', *Soil Science and Plant Nutrition*, 46(4), 873–883.
- Muñoz-Clares, R. a, Riveros-Rosas, H., Garza-Ramos, G., González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C., Julián-Sánchez, A. (2014) 'Exploring the evolutionary route of the acquisition of betaine aldehyde dehydrogenase activity by plant ALDH10 enzymes: implications for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine.', *BMC plant biology*, 14, 149.
- Murthy, M.S.R., Pande, S. V. (1994) 'Malonyl-CoA-sensitive and -insensitive carnitine

- palmitoyltransferase activities of microsomes are due to different proteins', *Journal of Biological Chemistry*, 269(28), 18283–18286.
- Mutomba, M.C., Yuan, H., Konyavko, M., Adachi, S., Yokoyama, C.B., Esser, V., Mcgarry, J.D., Babor, B.M., Gottlieb, R.A. (2000) 'Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and palmitoylcarnitine', *FEBS Letters*, 478, 19–25.
- Nakamura, T., Nomura, M., Mori, H., Jagendorf, A.T., Ueda, A., Takabe, T. (2001) 'An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley', *Plant and Cell Physiology*, 42(10), 1088–1092.
- Nakamura, T., Yokota, S., Muramoto, Y., Tsutsui, K., Oguri, Y., Fukui, K., Takabe, T. (1997) 'Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes', *Plant Journal*, 11(5), 1115–1120.
- Nakano, C., Takashima, S., Takeshita, K. (1989) 'Carnitine concentration during the development of human tissues', *Early Human Development*, 19(1), 21–27.
- Nalecz, K.A., Szczepankowska, D., Czeredys, M., Kulikova, N., Grzeskiewicz, S. (2007) 'Palmitoylcarnitine regulates estrification of lipids and promotes palmitoylation of GAP-43', *FEBS Letters*, 581, 3950–3954.
- Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D., Wilson, I. (2008) 'Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress', *Journal of Experimental Botany*, 59(2), 165–176.
- Nguyen, P.-J., Rippa, S., Rossez, Y., Perrin, Y. (2016) 'Acylcarnitines participate in developmental processes associated to lipid metabolism in plants', *Planta*, 243(4), 1011–1022.
- Niu, X., Tang, W., Huang, W., Ren, G., Wang, Q., Luo, D., Xiao, Y., Yang, S., Wang, F., Lu, B.-R., Gao, F., Lu, T., Liu, Y. (2008) 'RNAi-directed downregulation of OsBADH2 results in aroma (2-acetyl-1-pyrroline) production in rice (*Oryza sativa* L.)', *BMC plant biology*, 8, 100.
- Niu, X., Zheng, W., Lu, B.-R., Ren, G., Huang, W., Wang, S., Liu, J., Tang, Z., Luo, D., Wang, Y., Liu, Y. (2007) 'An unusual posttranscriptional processing in two betaine aldehyde dehydrogenase loci of cereal crops directed by short, direct repeats in response to stress conditions.', *Plant physiology*, 143(4), 1929–42.
- Nomura, M., Hibino, T., Takabe, T., Sugiyama, T., Yokota, A., Miyake, H., Takabe, T. (1998) 'Transgenically produced glycinebetaine protects ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from inactivation in *Synechococcus* sp. PCC7942 under salt stress', *Plant and Cell Physiology*, 39(4), 425–432.
- Oguri, Y., Nakamura, T., Takabe, T., Tsutsui, K., Muramoto, Y., Fukui, K., Yokota, S. (2003)

- 'Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes', *The Plant Journal*, 11(5), 1115–1120.
- Ohlrogge, J., Browse, J. (1995) 'Lipid biosynthesis', *The Plant cell*, 7, 957–70.
- Ohnishi, S., Okamura, N., Sakamoto, S., Hasegawa, H., Norikura, R., Kanaoka, E., Takahashi, K., Horie, K., Sakamoto, K., Baba, T. (2008) 'Role of Na⁺/L-carnitine transporter (OCTN2) in renal handling of pivaloylcarnitine and valproylcarnitine formed during pivalic acid-containing prodrugs and valproic acid treatment', *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 23(4), 293–303.
- Pagot, Y., Belin, J.M. (1996) 'Involvement of carnitine acyltransferases in peroxisomal fatty acid metabolism by the yeast *Pichia guilliermondii*', *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3864–3867.
- Palanivelu, R., Brass, L., Edlund, A.F., Preuss, D. (2003) 'Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an arabidopsis gene that controls GABA levels', *Cell*, 114(1), 47–59.
- Palmieri, L., Lasorsa, F.M., Iacobazzi, V., Runswick, M.J., Palmieri, F., Walker, J.E. (1999) 'Identification of the mitochondrial carnitine carrier in *Saccharomyces cerevisiae*', *FEBS Letters*, 462(3), 472–476.
- Panter, R.A., Mudd, J.B. (1969) 'Carnitine levels in some higher plants', *FEBS Letters*, 5(3), 169–170.
- Panter, R.A., Mudd, J.B. (1973) 'Some aspects of carnitine metabolism in avocado (*Persea americana*).', *The Biochemical journal*, 134, 655–58.
- Papageorgiou, G.C., Murata, N. (1995) 'The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving Photosystem II complex', *Photosynthesis research*, 243–252.
- Pearson, W.R. (2013) 'An Introduction to Sequence and Series ("Homology") Searching', *Curr Protoc bioinformatics*, 1(10), 1286–1292.
- 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.
- Perez-Miller, S.J., Hurley, T.D. (2003) 'Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase.', *Biochemistry*, 42(23), 7100–9.
- Planas-Portell, J., Gallart, M., Tiburcio, A.F., Altabella, T. (2013) 'Copper-containing amine oxidases contribute to terminal polyamine oxidation in peroxisomes and apoplast of *Arabidopsis thaliana*', *BMC Plant Biology*, 13(1), 1–13.
- Pochini, L., Oppedisano, F., Indiveri, C. (2004) 'Reconstitution into liposomes and functional

- characterization of the carnitine transporter from renal cell plasma membrane', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1661(1), 78–86.
- Poirier, Y., Antonenkov, V.D., Glumoff, T., Hiltunen, J.K. (2006) 'Peroxisomal β -oxidation — A metabolic pathway with multiple functions', *Biochimica et biophysica acta*, 1763, 1413–1426.
- Porcelli, V., Voza, A., Calcagnile, V., Gorgoglione, R., Arrigoni, R., Fontanesi, F., Marobbio, C.M.T., Castegna, A., Palmieri, F., Palmieri, L. (2018) 'Molecular identification and functional characterization of a novel glutamate transporter in yeast and plant mitochondria', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1859(11), 1249–1258.
- Ramsay, R.R., Gandour, R.D., Van Der Leij, F.R. (2001) 'Molecular enzymology of carnitine transfer and transport', *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1546(1), 21–43.
- Ramsay, R.R., Mancinelli, G., Arduini, A. (1991) 'Carnitine palmitoyltransferase in human erythrocyte membrane. Properties and malonyl-CoA sensitivity', *Biochemical Journal*, 275, 685–688.
- Rao, J.N., Warren, G.Z.L., Estolt-Povedano, S., Zammit, V.A., Ulmer, T.S. (2011) 'An environment-dependent structural switch underlies the regulation of carnitine palmitoyltransferase 1A', *Journal of Biological Chemistry*, 286(49), 42545–42554.
- Rathinasabapathi, B., McCue, K., Gage, D., Hanson, A. (1994) 'Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance', *Planta*, 193(2), 155–162.
- Rebouche, C.J., Engel, A.G. (1980) 'Tissue distribution of carnitine biosynthetic enzymes in man', *Biochimica et biophysica acta*, 630(1), 22–29.
- Reeve, I.T., Miller, M.G. (2002) '1,3-Dinitrobenzene metabolism and protein binding', *Chemical Research in Toxicology*, 15(3), 352–360.
- Reintanz, B., Lehnen, M., Reichelt, M., Gershenzon, J., Kowalczyk, M., Sandberg, G., Godde, M., Uhl, R., Palme, K. (2001) 'bus, a bushy Arabidopsis CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates', *The Plant Cell*, 13(2), 351.
- Reumann, S., Quan, S., Aung, K., Yang, P., Manandhar-Shrestha, K., Holbrook, D., Linka, N., Switzenberg, R., Wilkerson, C.G., Weber, A.P.M., Olsen, L.J., Hu, J. (2009) 'In-depth proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes combined with in vivo subcellular targeting verification indicates novel metabolic and regulatory functions of peroxisomes.', *Plant physiology*, 150(1), 125–43.

- Reznick, A., Kagan, V., Ramsey, R., Tsuchiya, M., Khwaja, S., Serbinova, E.A., Packer, L. (1992) 'Antiradical effects in L-propionyl carnitine of the heart against ischemia-reperfusion the possible role of iron chelation', *Archives of biochemistry and biophysics*, 296(2), 394–401.
- Rhodes, D., Hanson, A.D. (1993) 'Quaternary ammonium compounds in higher plants', *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44, 357–384.
- Riefler, M., Novak, A., Strnad, M., Schmülling, T. (2006) 'Arabidopsis cytokinin receptor Mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism', *The Plant cell*, 18(January), 40–54.
- Rippa, S., Zhao, Y., 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 : PPB / Société française de physiologie végétale*, 60, 109–14.
- Robinson, S.J., Tang, L.H., Mooney, B.A., McKay, S.J., Clarke, W.E., Links, M.G., Karcz, S., Regan, S., Wu, Y.Y., Gruber, M.Y., Cui, D., Yu, M., Parkin, I.A. (2009) 'An archived activation tagged population of Arabidopsis thaliana to facilitate forward genetics approaches', *BMC Plant Biology*, 9, 1–15.
- Rodríguez-Hernández, A.A., Muro-Medina, C.V., Ramírez-Alonso, J.I., Jiménez-Bremont, J.F. (2017) 'Modification of AtGRDP1 gene expression affects silique and seed development in Arabidopsis thaliana', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(2), 252–256.
- Van Roermund, C.W.T., Hetteema, E.H., Van Den Berg, M., Tabak, H.F., Wanders, R.J.A. (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', *EMBO Journal*, 18(21), 5843–5852.
- van Roermund, C.W.T., Visser, W.F., IJlst, L., van Cruchten, A., Boek, M., Kulik, W., Waterham, H.R., Wanders, R.J.A. (2008) 'The human peroxisomal ABC half transporter ALDP functions as a homodimer and accepts acyl-CoA esters', *The FASEB Journal*, 22(12), 4201–4208.
- Rothschild, H., Guzman, E.S. (1954) 'The oxidation of betaine aldehyde by betaine aldehyde dehydrogenase', *Journal of Biological Chemistry*, 209, 511–523.
- Roughan, G., Post-Beittenmiller, D., Ohlrogge, J., Browse, J. (1993) 'Is acetylcarnitine a substrate for fatty acid synthesis in plants?', *Plant physiology*, 101, 1157–1162.
- Le Rudulier, D., Strom, A. R., Dandekar, A. M., Smith, L.T., Valentine, R.C. (1984) 'Molecular biology of osmoregulation', *Science*, 224(4653), 1064–1068.
- Rufer, A.C., Thoma, R., Benz, J., Stihle, M., Gsell, B., De Roo, E., Banner, D.W., Mueller, F.,

- Chomienne, O., Hennig, M. (2006) 'The crystal structure of carnitine palmitoyltransferase 2 and implications for diabetes treatment', *Structure*, 14(4), 713–723.
- Russell, B.L., Rathinasabapathi, B., Hanson, A.D. (2002) 'Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth', *Plant Physiology*, 116(2), 859–865.
- Sachan, D.S., Hoppel, C.L. (1980) 'Carnitine biosynthesis, Hydroxylation of N6-trimethyl-lysine to 3-hydroxy-N6-trimethyl-lysine', *Biochemical Journal*, 188(2), 529–534.
- Sakamoto, A., Murata, N. (2000) 'Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: Current status and implications for enhancement of stress tolerance', *Journal of Experimental Botany*, 51(342), 81–88.
- Salas, J.J., Ohlrogge, J.B. (2002) 'Characterization of substrate specificity of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterases', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 403, 25–34.
- Samanta, S., Situ, A.J., Ulmer, T.S. (2014) 'Structural characterization of the regulatory domain of brain carnitine palmitoyltransferase 1', *Biopolymers*, 101(4), 398–405.
- Schmalix, W., Bandlow, W. (1993) 'The ethanol-inducible YAT1 gene from yeast encodes a presumptive mitochondrial outer carnitine acetyltransferase', *Journal of Biological Chemistry*, 268(36), 27428–27439.
- Schruff, M.C., Spielman, M., Tiwari, S., Adams, S., Fenby, N., Scott, R.J. (2005) 'The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of Arabidopsis links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs', *Development*, 133(2), 251–261.
- Schwabedissen-Gerbling, H., Gerhardt, B. (1995) 'Purification and characterization of carnitine acyltransferase from higher plant mitochondria', *Phytochemistry*, 39, 39–43.
- Sebela, M., Brauner, F., Radova, A., Jacobsen, S., Havilis, J., Galuszka, P., Pec, P. (2000) 'Characterisation of a homogeneous plant aminoaldehyde dehydrogenase', *Biochimica et biophysica acta*, 1480, 329–341.
- Sener, G., Paskaloğlu, K., Satiroglu, H., Alican, I., Kaçmaz, A., Sakarcan, A. (2004) 'L-carnitine ameliorates oxidative damage due to chronic renal failure in rats', *Journal of cardiovascular pharmacology*, 43(5), 698–705.
- Servillo, L., Giovane, A., Cautela, D., Castaldo, D., Balestrieri, M.L. (2014) 'Where does Nε-trimethyllysine for the carnitine biosynthesis in mammals come from?', *PloS one*, 9(1), e84589.
- Shelp, B.J., Bown, A.W., McLean, M.D. (1999) 'Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid', *Trends in Plant Science*, 4(11), 446–452.

- Shelp, B.J., Bozzo, G.G., Trobacher, C.P., Zarei, A., Deyman, K.L., Brikis, C.J. (2012) 'Hypothesis/review : Contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress', *Plant Science*, 193–194, 130–135.
- Shen, J., Zeng, Y., Zhuang, X., Sun, L., Yao, X., Pimpl, P., Jiang, L. (2013) 'Organelle pH in the arabidopsis endomembrane system', *Molecular Plant*, 6(5), 1419–1437.
- Shirasawa, K., Takabe, T., Takabe, T., Kishitani, S. (2006) 'Accumulation of glycinebetaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress.', *Annals of botany*, 98(3), 565–71.
- Sierra, A.Y., Gratacós, E., Carrasco, P., Clotet, J., Ureña, J., Serra, D., Asins, G., Hegardt, F.G., Casals, N. (2008) 'CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity', *Journal of Biological Chemistry*, 283(11), 6878–6885.
- Silva-Adaya, D., Pérez-De La Cruz, V., Herrera-Mundo, M.N., Mendoza-Macedo, K., Villeda-Hernández, J., Binienda, Z., Ali, S.F., Santamaría, A. (2008) 'Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: Antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine', *Journal of Neurochemistry*, 105, 677–689.
- Sobiesiak-Mirska, J., Nałecz, K.A. (2006) 'Palmitoylcarnitine modulates interaction between protein kinase C betaII and its receptor RACK1', *The FEBS journal*, 273, 1300–11.
- Sophos, N. a, Vasiliou, V. (2003) 'Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update', *Chemico-Biological Interactions*, 143–144, 5–22.
- Steiber, A., Kerner, J., Hoppel, C.L. (2004) 'Carnitine: A nutritional, biosynthetic, and functional perspective', *Molecular Aspects of Medicine*, 25(5–6), 455–473.
- Stemple, C.J., Davis, M.A., Michael, J., Hynes, M.J. (1998) 'The facC gene of *Aspergillus nidulans* encodes an acetate-inducible carnitine acetyltransferase', *Journal of Bacteriology*, 180(23), 6242–6251.
- Stephens, F.B., Constantin-teodosiu, D., Greenhaff, P.L. (2007) 'New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle', *Journal of Physiology*, 581(2), 431–444.
- Strijbis, K., van Roermund, C.W.T., Hardy, G.P., van den Burg, J., Bloem, K., de Haan, J., van Vlies, N., Wanders, R.J.A., Vaz, F.M., Distel, B. (2009) 'Identification and characterization of a complete carnitine biosynthesis pathway in *Candida albicans*', *The FASEB Journal*, 23, 2349–2359.
- Strijbis, K., Vaz, F.M., Distel, B. (2010) 'Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway', *IUBMB*

Life.

- Strocher, V.L., Boothe, J.G., Good, A.G. (1995) 'Molecular cloning and expression of a turgor-responsive gene in *Brassica napus*', *Plant Molecular Biology*, 27, 541–551.
- Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J.I., 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(51), 40064–40072.
- Tantikanjana, T., Yong, J.W.H., Letham, D.S., Griffith, M., Hussain, M., Ljung, K., Sandberg, G., Sundaresan, V. (2001) 'Control of axillary bud initiation and shoot architecture in *Arabidopsis* through the SUPERSHOOT gene', *Genes and development*, 15, 1577–1588.
- 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(4), 634–639.
- Thomas, D., Ariffin, A., Jalil, M.N., Young, B., Cooke, R., Wood, C. (1981) 'Effect of carnitine on greening larley leaves', *Phytochemistry*, 20(6), 1241–1244.
- Thomas, D.R., Jalil, M.N.H., Ariffin, A., Cooke, R.J., McLaren, I., Yong, B.C.S., Wood, C., Thomas, D.R., Jalil, M.N.H., Ariffin, A., Cooke, R.J., McLaren, I., Yong, B.C.S., Wood, C. (1983) 'The synthesis of short- and long-chain acylcarnitine by etio-chloroplasts of greening barley leaves', *Planta*, 158, 259–263.
- Thomas, D.R., Wood, C. (1986) 'The two beta-oxidation sites in pea cotyledons - Carnitine palmitoyltransferase: location and function in pea mitochondria', *Planta*, 168(2), 261–266.
- Tonazzi, A., Galluccio, M., Oppedisano, F., Indiveri, C. (2006) 'Functional reconstitution into liposomes and characterization of the carnitine transporter from rat liver microsomes', *Biochimica et biophysica acta*, 1758, 124–131.
- Trossat, C., Rathinasabapathi, B., Hanson, A.D. (2016) 'Transgenically Expressed Betaine Aldehyde Dehydrogenase Efficiently Catalyzes Oxidation of Dimethylsulfoniopropionaldehyde and [omega]-Aminoaldehydes', *Plant Physiology*, 113(4), 1457–1461.
- Tylichová, M., Kopecný, 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(4), 870–82.
- Vanella, A., Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Di Giacomo, C., Sorrenti, V., Barcellona, M.L. (2000) 'L-Propionyl-carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage

- protector', *Cell Biology and Toxicology*, 16, 99–104.
- Vaz, F.M., Van Gool, S., Ofman, R., Ijlst, L., Wanders, R.J.A. (1998) 'Carnitine biosynthesis: Identification of the cDNA encoding human γ -butyrobetaine hydroxylase', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250(2), 506–510.
- Vaz, F.M., Wanders, R.J.A. (2002) 'Carnitine biosynthesis in mammals', *The Biochemical journal*, 361(Pt 3), 417–429.
- Vaz, M., Fouchier, S.W., Ofman, R., Sommer, M., Wanders, R.J.A. (2000) 'Molecular and biochemical characterization of rat γ -trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis', *The Journal of biological chemistry*, 275(10), 7390–7394.
- Verhoeven, N.M., Roe, D.S., Kok, R.M., Wanders, R.J., Jakobs, C., Roe, C.R. (1998) 'Phytanic acid and pristanic acid are oxidized by sequential peroxisomal and mitochondrial reactions in cultured fibroblasts', *Journal of lipid research*, 39, 66–74.
- Vernez, L., Hopfgartner, G., Wenk, M., Krähenbühl, S. (2002) 'Determination of carnitine and acylcarnitines in urine by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry', *Journal of Chromatography A*, 984(2), 203–213.
- van Vlies, N., Tian, L., Overmars, H., Bootsma, A.H., Kulik, W., Wanders, R.J.A., Wood, P.A., Vaz, F.M. (2005) 'Characterization of carnitine and fatty acid metabolism in the long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mouse', *Biochemical Journal*, 387, 185–193.
- Voll, L.M., Jamai, A., Renné, P., Voll, H., McClung, C.R., Weber, A.P.M. (2006) 'The photorespiratory Arabidopsis shm1 mutant is deficient in SHM1', *Plant physiology*, 140, 59–66.
- Wallace, W., Secor, J., Schrader, L.E. (1984) 'Rapid accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation', *Plant Physiology*, 75(1), 170–175.
- Wang, Z., Benning, C. (2012) 'Chloroplast lipid synthesis and lipid trafficking through ER–plastid membrane contact sites', *Biochemical Society Transactions*, 40, 457–463.
- Warren, C.R. (2013) 'Quaternary ammonium compounds can be abundant in some soils and are taken up as intact molecules by plants', *New Phytologist*, 198(2), 476–485.
- Wei, Y., Lin, M., Oliver, D.J., Schnable, P.S. (2009) 'The roles of aldehyde dehydrogenases (ALDHs) in the PDH bypass of Arabidopsis', *BMC biochemistry*, 10, 7.
- Weigel, P., Weretilnyk, E.A., Hanson, A.D. (1986) 'Betaine aldehyde oxidation by spinach

- chloroplasts', *Plant Physiol*, 82, 753–759.
- Weretilnyk, A., Hanson, D. (1989) 'Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: purification, in vitro translation of the mRNA, and regulation by salinity', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 271(1), 56–63.
- Wood, A.J., Hirofumi, S., Rhodes, D., Joly, R.J., Goldsbrough, P.B. (1996) 'Betaine aldehyde dehydrogenase in Sorghum molecular cloning and expression of two related genes', *Plant physiology*, 110, 1301–1308.
- Wood, C., Jalil, M.N.H., McLaren, I., Yong, B.C.S., Ariffin, A., McNeil, P.H., Burgess, N., Thomas, D.R. (1984) 'Carnitine long-chain acyltransferase and oxidation of palmitate, palmitoyl coenzyme A and palmitoylcarnitine by pea mitochondria preparations', *Planta*, 161(3), 255–260.
- Wood, C., Noh Hj Jalil, M., Ariffin, A., Yong, B.C.S., Thomas, D.R. (1983) 'Carnitine short-chain acyltransferase in pea mitochondria', *Planta*, 158, 175–178.
- Wood, P.L., Khan, M.A., Moskal, J.R. (2007) 'The concept of "aldehyde load" in neurodegenerative mechanisms: Cytotoxicity of the polyamine degradation products hydrogen peroxide, acrolein, 3-aminopropanal, 3-acetamidopropanal and 4-aminobutanal in a retinal ganglion cell line', *Brain Research*, 1145(1), 150–156.
- Wymore, T., Hempel, J., Cho, S.S., Mackerell, A.D., Nicholas, H.B., Deerfield, D.W. (2004) 'Molecular recognition of aldehydes by aldehyde dehydrogenase and mechanism of nucleophile activation', *Proteins*, 57(4), 758–71.
- Xing, S.G., Jun, Y.B., Hau, Z.W., Liang, L.Y. (2007) 'Higher accumulation of γ -aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in Glycine max (L.) Merr. roots', *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(8), 560–566.
- Yancey, P., Clark, M., Hand, S., Bowlus, R., Somero, G. (1982) 'Living with water stress: evolution of osmolyte systems', *Science*, 217(4566), 1214–1222.
- Yancey, P.H. (2005) 'Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses', *Journal of Experimental Biology*, 208, 2819–2830.
- Yang, C., Zhou, Y., Fan, J., Fu, Y., Shen, L., Yao, Y., Li, R., Fu, S., Duan, R., Hu, X., Guo, J. (2015) 'SpBADH of the halophyte *Sesuvium portulacastrum* strongly confers drought tolerance through ROS scavenging in transgenic *Arabidopsis*', *Plant Physiology and Biochemistry*, 96, 377–387.
- Yin, X., Zhao, Y., Luo, D., Zhang, H. (2002) 'Isolating the promoter of a stress-induced gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase from the halophyte *Atriplex centralasiatica* Iljin', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1577(3), 452–456.

- Yu, Z., Li, W., Brunk, U.T. (2003) '3-Aminopropanal is a lysosomotropic aldehyde that causes oxidative stress and apoptosis by rupturing lysosomes', *Apmis*, 111(6), 643–652.
- Zammit, V.A., Ramsay, R.R., Bonomini, M., Arduini, A. (2009) 'Carnitine, mitochondrial function and therapy', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(14), 1353–1362.
- Zarei, A., Trobacher, C.P., Shelp, B.J. (2015) 'NAD⁺-aminoaldehyde dehydrogenase candidates for 4-aminobutyrate (GABA) and β -alanine production during terminal oxidation of polyamines in apple fruit', *FEBS Letters*, 589(19), 2695–2700.
- Zarei, A., Trobacher, C.P., Shelp, B.J. (2016) 'Arabidopsis aldehyde dehydrogenase 10 family members confer salt tolerance through putrescine-derived 4-aminobutyrate (GABA) production', *Scientific Reports*, 6(1), 35115.
- Zhai, Z., Liu, H., Shanklin, J. (2017) 'Phosphorylation of WRINKLED1 by KIN10 Results in Its Proteasomal Degradation, Providing a Link between Energy Homeostasis and Lipid Biosynthesis', *The Plant Cell*, 29(4), 871–889.
- Zhao, Y. (2014) *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 de l'Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France.

Résumé

La carnitine est un acide aminé non protéinogène présent dans l'ensemble du vivant. Son rôle dans le transport intracellulaire des acides gras est bien caractérisé chez les animaux. Chez les plantes aussi, la carnitine intervient dans le métabolisme lipidique, mais son rôle précis demeure peu documenté. Chez les animaux et les levures, la carnitine est synthétisée à partir de la triméthyllysine (TML) *via* 4 réactions enzymatiques. L'identification chez les plantes de la TML et de la γ -butyrobétaïne, le précurseur direct de la carnitine, suggère que la voie de biosynthèse de la carnitine chez les plantes est similaire à celle des animaux. Une recherche d'homologues a permis d'identifier les deux aldéhyde déshydrogénases 10 (ALDH10) d'*Arabidopsis* comme potentiellement impliquées dans la synthèse de γ -butyrobétaïne. Dans le cadre de ce travail de thèse, l'implication des AtALDH10 dans la biosynthèse de carnitine et dans la physiologie de la plante a été étudiée. Dans un premier temps, les AtALDH10 recombinantes ont été caractérisées *in vitro*. Cette étude indique qu'elles peuvent synthétiser la γ -butyrobétaïne, ainsi que des osmoprotectants. Ensuite, un mutant perte de fonction pour les deux AtALDH10 a été généré et étudié. Il présente une sensibilité accrue au stress salin, une hampe florale plus haute, un nombre plus élevé de hampes florales secondaires, et des siliques de taille réduite contenant moins de graines viables. Les graines parvenant à maturité sont enrichies en protéines et en lipides, et le développement de la plantule est plus rapide. Ces résultats suggèrent une intervention des AtALDH10 dans la réponse au stress hydrique, l'architecture de la plante, le développement précoce. La teneur en γ -butyrobétaïne dans les tissus est significativement réduite chez le mutant, confirmant le rôle des AtALDH10 dans la synthèse de γ -butyrobétaïne *in planta*. La teneur résiduelle en γ -butyrobétaïne semble suffisante pour maintenir une teneur en carnitine inchangée. Cela pose la question de la régulation de la voie de biosynthèse de la carnitine chez les plantes, et suggère un lien entre la γ -butyrobétaïne et la réponse au stress, les voies de signalisation et l'architecture de la plante. Outre ce travail, une recherche bioinformatique a permis d'identifier une protéine d'*Arabidopsis* dont la structure est proche de celle de l'enzyme humaine responsable de la conversion de la γ -butyrobétaïne en carnitine. L'étude de cette protéine n'a pas confirmé son implication dans la synthèse de carnitine. L'identification et la caractérisation de mutants affectés dans la synthèse de carnitine ou son intervention dans le transport des acides gras serait précieuse pour une meilleure compréhension du rôle de la carnitine chez les plantes.

Mots clés : carnitine, γ -butyrobétaïne, développement précoce, métabolisme lipidique, aldéhyde déshydrogénase 10, stress salin

Abstract

Carnitine is a non-proteinogenic amino acid present in all living organisms. Its role in the intracellular transport of fatty acids is well characterized in animals. In plants also, carnitine is linked to lipid metabolism, but its precise role remains poorly understood. In animals and yeasts, carnitine is synthesized from trimethyllysine (TML) through 4 enzymatic steps. The identification in plant tissues of TML and γ -butyrobetaine, the direct precursor of carnitine, suggests that its biosynthesis follows the same steps. A bioinformatics research of candidates identified the two ALDH10 enzymes as possibly involved in the synthesis of γ -butyrobetaine. The present study deals with the characterization of the AtALDH10s, to elucidate their role in carnitine biosynthesis and plant physiology. Firstly, the two AtALDH10s were characterized *in vitro*. This study demonstrates their capability to synthesize γ -butyrobetaine, as well as osmoprotectants. Secondly, an Arabidopsis loss-of-function for the two AtALDH10 has been obtained and characterized. This mutant is more sensitive to salt stress, bears a longer main shoot and more secondary shoots, and smaller siliques containing less seeds. Its viable seeds are enriched in proteins and fatty acids, and the seedling development is faster. These results suggest an intervention of AtALDH10s in the resistance to osmotic stress, the control of plant architecture and the early development. The γ -butyrobetaine content is reduced in the mutant, confirming the involvement of AtALDH10s in the synthesis of γ -butyrobetaine *in planta*. The residual content of γ -butyrobetaine seems to be sufficient to maintain an unchanged level of carnitine in the mutant. These results raise the question of the regulation of the carnitine biosynthesis pathway and suggest that γ -butyrobetaine could be involved in response to osmotic stress, signalisation pathways and plant architecture. Besides this work, a bioinformatic research lead to the identification of a protein with a structure close to that of the enzyme involved in the conversion of γ -butyrobetaine into carnitine in humans. However, the characterization of this protein did not confirm its involvement in carnitine biosynthesis. The identification and characterization of mutants impaired in enzymatic activities linked to carnitine, such as its biosynthesis or its intervention in the transport of fatty acids, would be valuable to pave the way of a better understanding of the role of carnitine in plants.

Keywords: carnitine, γ -butyrobétaine, early development, lipid metabolism, aldehyde dehydrogenase 10, salt stress