

Par **Phuong Jean NGUYEN**

Intervention de la carnitine au cours du développement normal ou affecté chez *Arabidopsis thaliana*, en lien avec le métabolisme des lipides

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



Soutenue le 20 juin 2014
Spécialité : Génie Enzymatique et Cellulaire

D1839

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR de L'UNIVERSITE de TECHNOLOGIE de COMPIEGNE

Unité de Recherche FRE CNRS 3580

Laboratoire Génie Enzymatique et Cellulaire

Par

Phuong Jean NGUYEN



Intervention de la carnitine au cours du développement
normal ou affecté chez *Arabidopsis thaliana*, en lien
avec le métabolisme des lipides.

Soutenance le 20 juin 2014

Devant le jury composé de :

Pierre CAROL, Pr.	Université Pierre et Marie Curie de Paris VI	Rapporteur
Alain ZACHOWSKY, DR.	Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris	Rapporteur
Laurent GUTIERREZ, IGR.	Centre de Ressources Régionales en Biologie Moléculaire d'Amiens	Examinateur
Alain FRIBOULET, DR.	Université de Technologie de Compiègne	Président
Yolande PERRIN, Dr.	Université de Technologie de Compiègne	Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le **Pr Alain Friboulet**, le **Pr Pierre Carol**, le **Dr Alain Zachowsky** et le **Dr Laurent Gutierrez** d'avoir accepté de faire partie de la commission d'examen de cette thèse.

Je remercie tout particulièrement le **Pr Daniel Thomas**, le grand chef, pour avoir contribué à faire rayonner l'UTC par son génie, son talent d'orateur, son dynamisme, son humilité et son humour, sans qui nous n'aurions pas eu l'occasion de faire notre thèse au sein même de ce laboratoire.

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

Ma gratitude va également au **Pr Karsten Haupt** et le **Dr Brigitte Thomasset** pour m'avoir aidé à finir ma thèse.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, le **Dr Yolande Perrin** de m'avoir accueilli dans son équipe. Je suis sincèrement reconnaissant envers elle pour sa patience, sa disponibilité, son soutien, ses conseils scientifiques toujours pertinents et pour tout le temps et l'énergie qu'elle a consacré à superviser mon travail, afin de me former efficacement au monde de la recherche, pour toutes ces raisons encore merci.

Je remercie vivement le **Dr Sonia Rippa** pour sa gentillesse, sa disponibilité et la pertinence de ses conseils techniques qui furent une aide appréciable au cours de ma thèse.

Un grand merci à ma petite sœur de l'équipe « carnitine », **Ying Juan Zhao** qui m'a toujours soutenu dans cette aventure et qui reste dans mon cœur malgré la distance...

Je remercie également les (ex-)membres de l'équipe végétale, **Elie**, **Mohamed** et **Abdel**, pour tous leurs conseils avisés et ainsi que mon ami **Sébastien Acket** de son aide et de son franc-parler de « PICARD », que j'adore.

Je remercie beaucoup **Franck Merlier** pour son amabilité, sa disponibilité, ses précieux conseils techniques et son aide sur les analyses de spectrométrie de masse, ainsi que **Valérie Devilliers** pour son aide technique et sa gentillesse. Merci également à **Christiane**

Hervagault, Chantal David, Sylvie Carlier, Carol Schembri, Valérie Santoni, Pascal Boulnois, pour tout le soutien administratif et technique, qu'ils savent nous apporter avec tant d'enthousiasme.

Je remercie également l'ensemble du laboratoire GEC et les personnes que j'ai oublié, qui ont su me supporter pendant ces quatre années de thèse.

Je tiens à remercier sincèrement **Laurent Gutierrez, Stéphanie Guénin, Gaëlle Mongelard, Hervé Demailly** et **Christophe Pineau** de m'avoir accueilli et conseillé au sein du Centre de Ressources Régionales en Biologie Moléculaire, mais également pour m'avoir toujours soutenu dans mes projets.

Je remercie également le **Dr Yolande Perrin**, le **Dr Sandrine Morandat**, le **Dr Sévérine Padiolleau**, le **Dr Aude Cordin**, pour m'avoir donné la formidable chance d'effectuer des enseignements au cours de ma thèse.

Merci mon ami de galère **Thierry Johan Robin** *alias DOUDOU*, pour tes blagues pertinentes (ou pas), ta gaieté et également pour tout ton soutien dans les moments difficiles, en fait je veux dire merci pour ton rhum !

Je n'oublie pas de remercier le **Pr Karlsten Haupt** et le **Dr Bernadette Tse Sum Bui** pour leur gentillesse, pour avoir donné à ce laboratoire sa dimension internationale et m'avoir associé à leur équipe. Ainsi, MERCI à **Pinar, Zeynep, Jacqueline, Serena, Melody, Xuan Anh, Sofia, Marcelina, Yi** et **Carlo**... pour tous ces petits **repas** ou **gâteaux** délectables et les moments formidables passés ensemble qui resteront des souvenirs inoubliables. Un grand merci également à mes amis **Yannick, Li Binh, Nataliya, Paolo, Frank, Maria** pour avoir partagé ce bureau étroit, a bit messy, noisy, but friendly always.

Je remercie bien évidemment toute ma formidable famille, **papa, maman, mes frères, Pierre, Michel, Hoang, Ezzedine, Mai, Kostas**..., tous ces amis qui contribuent tous les jours à faire de ma vie ce qu'elle est, car « La Vie Est BelLe, aLorS Je SoUrIs à La ViE... »

Et enfin, je te remercie Toi...**HT**

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
-----------------------------	----

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	14
---	-----------

1. INTRODUCTION AU SUJET DE THESE.....	15
2. METABOLISME DES LIPIDES	16
2.1. Synthèse de lipides chez les végétaux.....	16
2.1.1. Synthèse des acides gras.....	16
2.1.2. Synthèse des glycérolipides membranaires.....	19
2.1.2.1. La voie procaryotique.....	20
2.1.2.2. La voie eucaryotique	22
2.1.3. Synthèse des lipides de réserve : les triglycérides.....	24
2.2. Catabolisme des AG lors du développement post-germinatif	25
2.2.1. Lipolyse des TAG.....	26
2.2.2. β -oxydation peroxysomal des acyl-CoA.....	26
2.2.3. Cycle glyoxylique et néoglucogenèse.....	27
2.3. Le recyclage des lipides lors de la sénescence	29
2.4. Composition lipidique de certains organes et organites chez Arabidopsis.....	29
2.5. Modulation du métabolisme lipidique lors de stress	30
2.5.1. Réponse de la plante à une exposition prolongée au froid	31
2.5.2. Réponse de la plante lors d'une carence en phosphate.....	31
2.6. Transport intracellulaire des lipides.....	32
2.6.1. Transfert de lipides par contact direct entre les membranes des organites	33
2.6.2. Transport vésiculaire	34
2.6.3. Transport par mouvement flip flop	34

2.6.4.	Trafic intracellulaire des AG	35
3.	LA CARNITINE DANS LE METABOLISME ANIMAL ET MICROBIEN.....	37
3.1.	Généralités.....	37
3.2.	Biosynthèse de la carnitine	38
3.3.	Homéostasie de la carnitine	38
3.4.	Dosage de la carnitine et des acyl-carnitines	39
3.5.	Activité transférases dans le métabolisme de la carnitine	39
3.6.	Rôles biologiques de la carnitine	41
3.6.1.	Implication dans le transport intracellulaire des AG activés	41
3.6.2.	Homéostasie du pool d'acétyl-CoA/CoA	42
3.6.3.	Interaction avec les protéines et acylation	43
3.6.4.	Détoxification.....	44
3.6.5.	Propriété antioxydante	44
3.6.6.	Propriété osmoprotectante	45
4.	AVANCEE DES CONNAISSANCES SUR LA CARNITINE CHEZ LES PLANTES	45
4.1.	Présence de la carnitine chez les plantes.....	45
4.2.	Activités carnitine acyl-transférases	46
4.3.	Biosynthèse de la carnitine chez les plantes	47
4.4.	Transport de la carnitine chez les plantes	49
4.5.	Rôles possibles de la carnitine chez les plantes	49
4.5.1.	Implication de la carnitine dans une β -oxydation mitochondriale.....	49
4.5.2.	Synthèse et trafic lipidique	50
4.5.3.	Protection cellulaire	51
4.5.4.	Régulation hormonale.....	51

MATERIEL & METHODES.....	52
1. MATERIEL VEGETAL	53
1.1. Culture <i>in vitro</i> des plantes	53
1.1.1. Culture des plantes en condition normale	53
1.1.2. Expériences d'étiollement et de dé-étiollement	53
1.1.3. Exposition au froid des plantules d'Arabidopsis.....	54
1.1.4. Culture sur des milieux M&S modifiés	54
1.1.5. Organogénèse	54
1.2. Culture des plantes en serre	55
1.3. Détermination de la matière sèche	55
2. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES ET ANALYTIQUES.....	56
2.1. Extraction et quantification des carnitines	56
2.1.1. Extraction de la carnitine libre et des acyl-carnitines.....	56
2.1.2. Extraction de la carnitine estérifiée.....	56
2.1.3. Analyse et quantification des carnitines par spectrométrie de masse triple quadripôle (QQQ-MS/MS) 57	
2.1.3.1. Analyse des carnitines	57
2.1.3.2. Quantification des carnitines	59
2.1.4. Recherche des esters de carnitine par spectrométrie à temps de vol (qTOF-MS/MS).....	60
2.1.4.1. Préparation des échantillons	60
2.1.4.2. Analyse des esters de carnitine	60
2.2. Analyse de l'expression de gènes d'intérêt	61
2.2.1. Extraction d'ARN totaux de plantes	61
2.2.2. Electrophorèse sur gel d'agarose	61
2.2.3. Traitement DNase et transcription inverse.....	61
2.2.4. Analyse par PCR quantitative en temps réel (Real-time qPCR)	61
3. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES	63

RESULTATS & DISCUSSION	64
1. OPTIMISATIONS	65
1.1. Optimisation du dosage de la carnitine chez les plantes	65
1.1.1. Paramètres de fragmentation	66
1.1.2. Paramètres de la source	68
1.1.3. Conditions de séparation	70
1.1.3.1. Principe d'une séparation par une colonne de chromatographie de type HILIC	70
1.1.3.2. Séparation de la carnitine et de l'acétyl-carnitine sur colonne HILIC	71
1.1.3.3. Séparation des acyl-carnitines sur colonne HILIC	73
1.1.4. Quantification de la carnitine	75
1.1.4.1. Choix de l'étalon interne	75
1.1.4.2. Etalonnage de la carnitine par rapport à la carnitine-d ₃	76
1.1.5. Quantification des acyl-carnitines	77
1.1.5.1. Choix de l'étalon interne	77
1.1.5.2. Etalonnage des acyl-carnitines par rapport à la ¹³ C-palmitoyl-carnitine	78
1.1.6. Analyse d'un extrait de plantules d'Arabidopsis par LC-QQQ-MS/MS	79
1.1.7. Détermination des coefficients d'ionisation de la stéaroyl-, de l'oléoyl- et de la linoléoyl-carnitine par rapport à l'étalon interne ¹³ C-palmitoyl-carnitine.	81
2. EVOLUTION DES TENEURS EN CARNITINES AU COURS DU DEVELOPPEMENT NORMAL	83
2.1. Développement post-germinatif	83
2.2. Analyse des carnitines	84
2.2.1. Analyse des fractions libre et estérifiée de la carnitine	84
2.2.2. Analyse des acyl-carnitines	85
2.3. Perturbation du catabolisme des TAG	89
2.4. Processus de dé-étiolement	92
2.4.1. Dosage des chlorophylles	93
2.4.2. Dosage des carnitines	94

2.5.	Expression de gènes de la synthèse lipidique au cours du développement post-germinatif ..	96
2.6.	Analyse des esters de carnitine	101
2.6.1.	Validation du colza en post-germination	102
2.6.2.	Candidats potentiels.....	104
2.7.	Embryogenèse	107
2.8.	Organogenèse	110
3.	EVOLUTION DES TENEURS EN CARNITINES AU COURS DU DEVELOPPEMENT AFFECTE	116
3.1.	Carence en phosphate	116
3.1.1.	Réponses développementales	119
3.1.2.	Dosage des différentes fractions de carnitine.....	119
3.2.	Acclimatation au froid	121
3.2.1.	Evolution des différentes fractions de carnitine	121
3.2.2.	Expression de gènes de la synthèse lipidique	123
3.3.	Influence de l'ETOMOXIR sur les acyl-carnitines palmitoyl-transférases de la plante.....	126
 CONCLUSION GENERALE &PERSPECTIVES		129
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		137
 ANNEXES.....		155

LISTE DES ABREVIATIONS

AG	Acide gras
ACP	Acyl carrier protein
ADN	Acide desoxyribonucléique
Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
C2:0	Acétate
C12:0	Acide dodécanoïque
C14:0	Acide myristique
C16:0	Acide palmitique
C18:0	Acide stéarique
C18:1	Acide oléique
C18:2	Acide linoléique
C18:3	Acide linolénique
C20	Acide arachidique
Carnitine-d ₃	Carnitine deutérée
CAT	Carnitine acétyl-transférase
CBF	C-REPEAT/DRE BINDING FACTOR
CoA	Coenzyme A
CoASH	Coenzyme A réduit
COT	Carnitine octanoyl-transférase
CPT	Carnitine palmitoyl-transférase
CPT1 ou CPTe	Carnitine palmitoyl-transférase de la mb externe de la mitochondrie
CPT2 ou CPTi	Carnitine palmitoyl-transférase de la mb interne de la mitochondrie
CSY	Citrate synthase
CTS	Protéine COMATOSE

DAG	Diacylglycérol
DGDG	Digalactosyldiacylglycérol
ESI	Electrospray ionization
<i>et al.</i>	<i>et alii.</i> et autres
FAD	Fatty acid desaturase
FAT A/B	Fatty acyl-ACP thioesterase A/B
g	Unité d'accélération
G-3-P	Glycérol-3-phosphate
GPAT	Glycérol-3-phosphate acyl-transférase
HILIC	Colonne de chromatographie à interactions hydrophiles
ICL	Isocitrate lyase
KAS	ketoacyl-ACP synthase
KAT	ketoacyl-CoA thiolase
LACS	Long-chain acyl-CoA synthase
LC	Liquid chromatography
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry
LCFA	Long chain fatty acid
LPA	Lysophosphatidic acid
LPAAT	Lysophosphatidic acid acyl-transférase
LPCAT	Lysophosphatidylcholine acyl-transférase
M&S	Milieu de culture Murashige & Skoog
m/z	masse/charge
MCFA	Moyenne chain fatty acid
MGDG	Monogalactosyldiacylglycérol
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Mass spectrometry
MS	Matière sèche
mU	Milli-unité

OCT	Organic cation transporteur
PA	Phosphatidic acid
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Polymerisation chain reaction
PE	Phosphatidylethanolamine
PG	Phosphatidylglycérol
pg/mg MS	Picogramme par milligramme de matière sèche
PI	Phosphatidylinositol
PI	Post-imbibition
PPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PS	Phosphatidylserine
PUFA	Acides gras poly-insaturés
qPCR	PCR quantitative
QQQ-MS/MS	Spectrométrie de masse de type triple quadripôle en tandem
TOF-MS/MS	Spectrométrie de masse à temps de vol en tandem
RE	Reticulum endoplasmique
rpm	Rotation per minute
RT	Reverse transcription
sn	numérotation stéréochimique
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycérol
TAG	Triacylglycerol
TCA	tricarboxylic acid cycle
VLCFA	Very long chain fatty acid
WS	Wassilewskija

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

1. INTRODUCTION AU SUJET DE THESE

Le sujet de cette thèse porte sur l'« **Intervention de la carnitine au cours du développement normal ou affecté chez *Arabidopsis thaliana*, en lien avec le métabolisme des lipides** ».

Notre équipe appartient au laboratoire FRE CNRS 3580 « Génie Enzymatique et Cellulaire » et a pour thématique de recherche « la biocatalyse et les alternatives métaboliques ». Un des axes de cette thématique porte plus spécifiquement sur le métabolisme lipidique des plantes oléagineuses avec une optique finalisée de production d'huiles adaptées à l'industrie.

La modification des profils spécifiques en acides gras (AG) dans des huiles végétales peut servir à l'amélioration de leur qualité nutritionnelle, mais également à l'émergence d'une industrie biosourcée où les AG peuvent représenter une alternative aux ressources carbonées fossiles dans divers domaines d'application tels que les carburants, les lubrifiants, les tensioactifs, les résines, les polymères (Ohlrogge, 1994 ; Napier, 2007 ; Wu *et al.*, 2012).

Notre travail vise notamment à la production d'AG inhabituels portant des groupements chimiques particuliers (méthyle, cyclopropane,...) par des plantes oléagineuses d'intérêt agronomique ou des sources microbiennes alternatives, issues de sélection variétale classique ou d'approches biotechnologiques. Or, le métabolisme primaire de l'embryon en développement, dans lequel s'accumule l'huile lorsqu'il s'agit de plantes oléagineuses, est un système complexe, compartimenté et hautement régulé. Ceci engendre des difficultés à modifier le profil en AG des huiles végétales, partagées par l'ensemble des équipes de recherche impliquées, et pointe la nécessité d'améliorer les connaissances sur le métabolisme des AG et des lipides.

Dans ce contexte, notre équipe suit en parallèle 2 axes de recherche. Le premier axe met en œuvre une approche intégrative associant les outils de la génomique fonctionnelle et de la modélisation des flux métaboliques dans des embryons en développement de colza et de lin, pour déterminer les points de contrôle des flux métaboliques. Le second axe porte sur la spécificité et la compartimentation des systèmes enzymatiques qui interviennent dans la prise en charge des AG, sous forme d'acyl-CoA, dans les synthèses lipidiques chez les plantes oléagineuses. Sur cet aspect, les enzymes intervenant dans la biosynthèse des AG sont aujourd'hui bien caractérisées chez les plantes, alors que des incertitudes persistent concernant les voies de transfert des AG du pool d'acyl-CoA vers les précurseurs lipidiques, et les formes de transport entre les différents compartiments impliqués dans les synthèses lipidiques (plaste, cytosol, réticulum endoplasmique).

Un acteur essentiel de la prise en charge des AG chez l'animal et la levure est la carnitine, qui s'associe de manière réversible aux AG en échange du coenzyme A, dans le cadre notamment des transports intracellulaires. La présence avérée chez la plante d'acyl-carnitines au côté de la carnitine libre, et la mise en évidence d'activités enzymatiques associées, prouvent le lien entre la carnitine et le métabolisme des AG chez la plante à l'instar de l'animal et de la levure. Le travail de cette thèse a donc porté sur un approfondissement des connaissances sur le rôle de la carnitine dans le métabolisme lipidique chez *Arabidopsis thaliana*, par une optimisation des techniques analytiques pour une analyse plus exhaustive des esters de carnitine et par une analyse des acyl-carnitines au cours de processus développementaux (germination, embryogenèse et organogenèse) ou de processus adaptatifs (réponse au stress) qui impliquent le métabolisme lipidique de manière accrue.

2. METABOLISME DES LIPIDES

2.1. Synthèse de lipides chez les végétaux

2.1.1. Synthèse des acides gras

Les AG sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique de longueur variable qui possède généralement un nombre pair de carbones. Les AG sont classés en 4 groupes selon la longueur de la chaîne : les courtes chaînes carbonées de C2:0 à C6:0 (SCFA : small chain fatty acid), les chaînes moyennes de C6:0 à C12:0 (MCFA : medium chain fatty acid), les longues chaînes de C12:0 à C18:0 (LCFA : long chain fatty acid) et les très longues chaînes au-delà de 18 carbones (VLCFA : very long chain fatty acid) (Figure 1). Chez les plantes, les AG majoritaires sont l'acide palmitique (C16:0) et les AG à 18 carbones (C18:y comportant de une à trois insaturations).

La synthèse de certains AG est réalisée dans la mitochondrie ou le peroxysome (Gueguen *et al.*, 2000 ; Lucas *et al.*, 2007), mais les AG habituels sont principalement synthétisés dans les plastes avec comme précurseur carboné l'acétyl-CoA (Olhrogge & Browse, 1995). Chez *Arabidopsis*, la pyruvate deshydrogenase (EC 1.2.4.1) plastidiale est la voie principale permettant un approvisionnement rapide et stable en acétyl-CoA à travers son action sur le pyruvate (issu de la glycolyse ou de la voie des pentoses phosphate). Une autre source possible est l'importation et l'activation d'acétate libre en acétyl-CoA par l'acétyl-CoA synthase (ACS ; EC 6.2.1.1) (Lin & Oliver, 2008). Cette voie alternative pourrait avoir un

rôle dans la détoxification de produits de fermentation aérobie tels que l'éthanol, l'acétaldéhyde et/ou l'acétate.

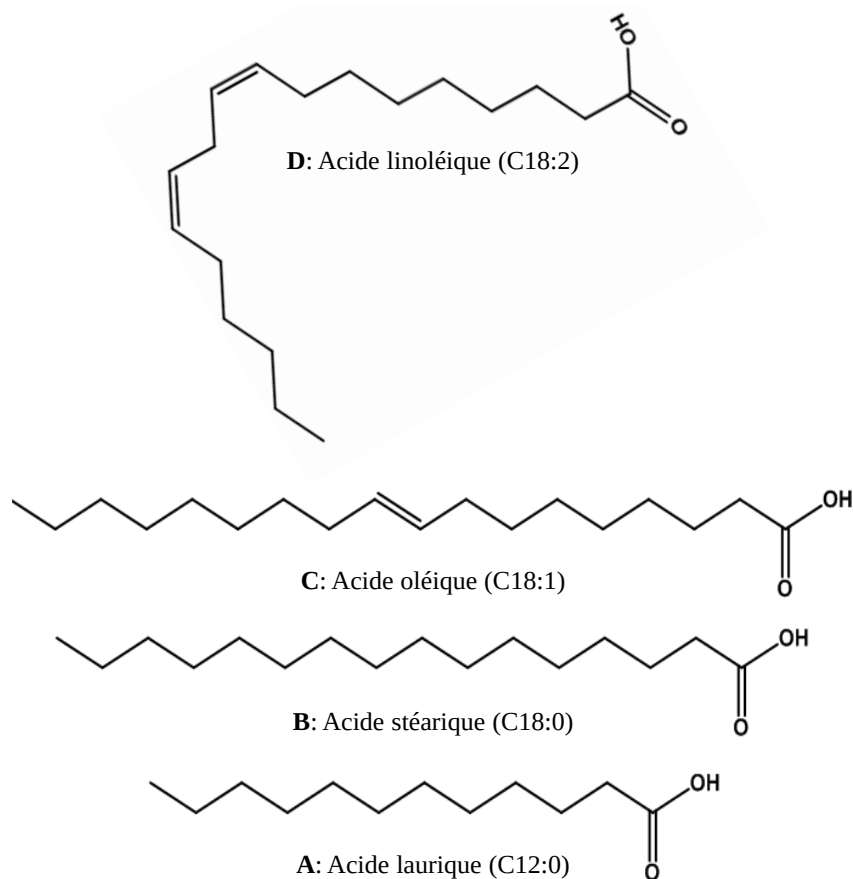


Figure 1 Exemples d'AG à moyenne chaîne (**A**), longue chaîne saturée (**B**), à longue chaîne mono- et poly-insaturée (**C** et **D**). Nomenclature des AG « Cx:y », x indique le nombre d'atomes de carbone ; y le nombre d'insaturation(s).

La biosynthèse des AG est réalisée en plusieurs étapes et commence par la formation de malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA par action de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC ; EC 6.4.1.2) (Li-Beisson *et al.*, 2010) (Figure 2). Le malonyl-CoA est estérifié (par la malonyl-CoA : ACP transacylase ; EC 2.3.1.39) à une acyl carrier protein (ACP) qui sera en charge du transfert des chaînes en élongation vers les différentes enzymes intervenant tout au long de la biosynthèse. La première condensation a lieu entre l'acétyl-CoA et le malonyl-ACP et forme un produit à quatre carbones et cette réaction est catalysée par la ketoacyl-ACP synthase (KAS III ; EC 2.3.1.180). Le composé initial en C4:0 est pris en charge par le système fatty acid synthase (FAS) qui permet de rallonger l'acyl-ACP de 2 carbones au cours de chaque cycle. Ce système est constitué de 4 partenaires enzymatiques en charge des réactions de

condensation (ketoacyl-ACP synthase I ou KAS I ; EC 2.3.1.41), de réduction (ketoacyl-ACP reductase ; EC 1.1.1.100), de déshydratation (hydroacyl-ACP deshydratase ; EC 4.2.1.59) et de réduction (enoyl-ACP reductase ; EC 1.3.1.9) permettant la condensation de malonyl-ACP sur l'acyl-ACP en élongation.

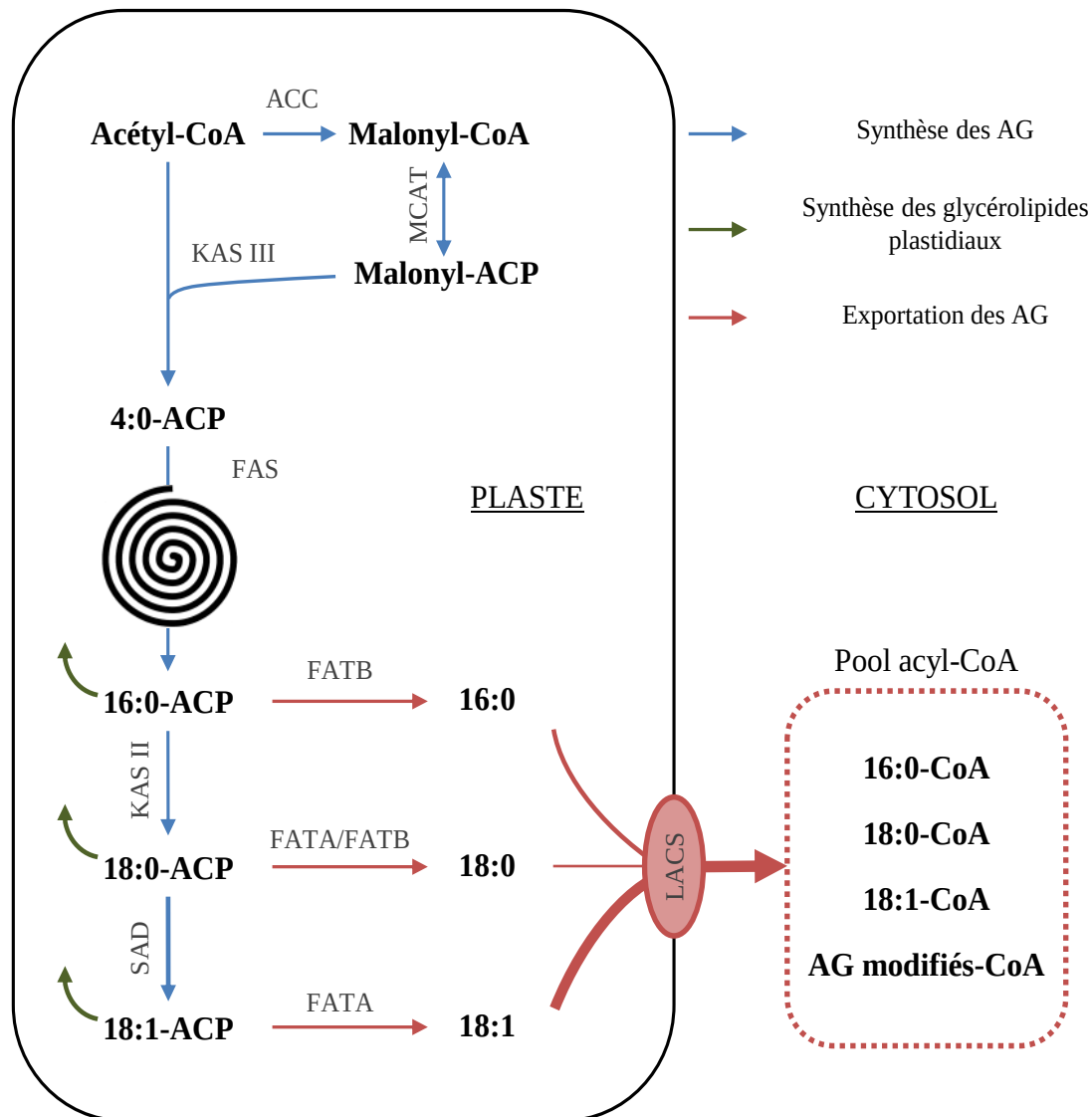


Figure 2 Représentation schématique de la synthèse et de l'exportation des AG activés du plaste vers le cytosol. Abréviations : **ACC**, acétyl-CoA carboxylase ; **ACP**, acyl carrier protein ; **AG**, acide gras ; **CoA**, coenzyme A ; **FAS**, fatty acid synthase ; **FATA/B**, fatty acyl-ACP thioesterase ; **KAS**, ketoacyl-ACP synthase ; **LACS**, long-chain acyl-CoA synthetase ; **MCAT**, malonyl-CoA : ACP transacylase ; **SAD**, stearoyl-ACP désaturase.

La C16:0-ACP formée après 7 cycles peut subir 3 réactions, soit (1) participer à la synthèse de lipides membranaires plastidiaux (cf. §2.1.2.1, p 20), soit (2) être hydrolysée par

la fatty acyl-ACP thioesterase FATB (EC 3.1.2.22) (Bonaventure *et al.*, 2003) ou (3) subir à nouveau un cycle d'élongation pour être converti en C18:0-ACP par la KAS II (EC 2.3.1.179) (Figure 2). Dans le second cas, l'acide palmitique libéré est alors activé en ester de coenzyme A par l'action de long-chain acyl-CoA synthetases (LACS ; EC 6.2.1.3) (Schnurr *et al.*, 2002) et est exporté vers le cytosol. Dans le troisième cas, la C18:0-ACP synthétisée est désaturée par une stearoyl-ACP désaturase (SAD, FAB2 ; EC 1.14.19.2) (Lightner *et al.*, 1994). La C18:1-ACP formée peut participer à la synthèse de lipides membranaires plastidiaux ou est hydrolysée par FATA (EC 3.1.2.14) (Salas & Ohlrogge, 2002), avant d'être exportée du plaste. De manière générale, le substrat préférentiel de FATA est la C18:1-ACP, mais cette enzyme montre également une faible affinité pour la C18:0-, la C16:1-, et la C16:0-ACP. En revanche, FATB présente un large éventail de substrats avec une forte affinité pour la C16:0-, la C18:1-, la C18:0, la C16:1-, et la C14:0-ACP (Salas & Ohlrogge, 2002).

2.1.2. Synthèse des glycérolipides membranaires

Les membranes des cellules eucaryotes ont des fonctions multiples en assurant la compartimentation physique à l'échelle cellulaire et subcellulaire, la régulation des échanges par le transport de métabolites et de macromolécules, la communication cellulaire (récepteurs hormonaux, antigènes de surfaces, transduction de signaux...) et certaines réactions métaboliques spécifiques. Au sein d'une même cellule, il n'est donc pas surprenant de rencontrer différents types de membranes avec une composition lipidique et protéique spécifique qui va déterminer leurs fonctions respectives (Benning, 2009). Les glycérolipides (esters d'AG et de glycérol) sont prédominants dans les membranes et résultent de l'estérification de deux AG au glycérol-3-phosphate (G-3-P), donnant un acide

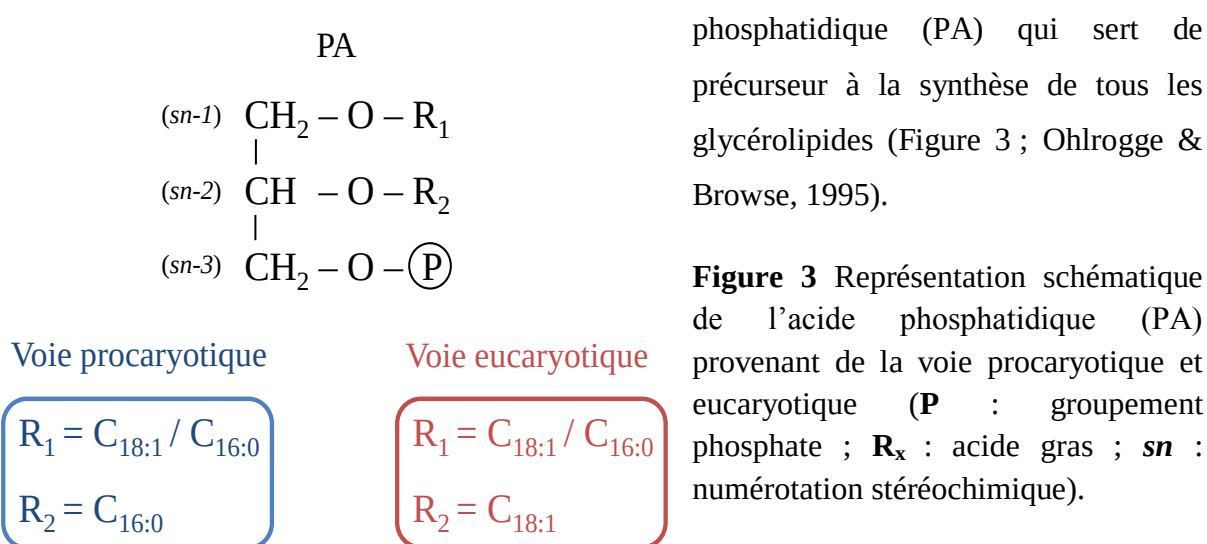


Figure 3 Représentation schématique de l'acide phosphatidique (PA) provenant de la voie procaryotique et eucaryotique (**P** : groupement phosphate ; **R_x** : acide gras ; **sn** : numérotation stéréochimique).

Des expériences de radiomarquage et l'étude de nombreux mutants altérés dans la composition en AG ont contribué à améliorer les connaissances sur la synthèse des lipides membranaires. Cette synthèse est principalement effectuée par deux voies métaboliques qualifiées de procaryotique et d'eucaryotique (Roughan & Slack, 1982 ; Browse *et al.*, 1993 ; Wallis & Browse, 2002).

2.1.2.1. La voie procaryotique

La voie procaryotique se déroule dans les plastes et conduit à la synthèse de glycérolipides constitutifs de l'ensemble des membranes plastidiales (Figure 4). Dans un premier temps, au niveau de la membrane interne du plaste, la G-3-P acyl-transférase 1 (GPAT1 ou ATS1 ; EC 2.3.1.15) (Ohlrogge & Browse, 1995 ; Xu *et al.*, 2006) incorpore un acide palmitique ou oléique en position *sn-1* du G-3-P pour former de l'acide lysophosphatidique (LPA). Puis, du PA est formé par attachement d'acide palmitique (qui est son substrat préférentiel) en position *sn-2* du LPA par la lysophosphatidic acid acyl-transférase plastidiale (LPAAT1 ; EC 2.3.1.51 ; Kim & Huang, 2004). Le PA est ensuite converti en diacylglycérol (DAG) par une phosphatidic acid phosphatase (PAP ; EC 3.1.3.4) qui sert de précurseur à la formation de glyco glycérolipides ou galactolipides (monogalactosyldiacylglycérol, MGDG ; digalactosyldiacylglycérol, DGDG), de sulfolipide (sulfoquinovosyldiacylglycérol, SQDG) et de phosphoglycérolipide (phosphatidylglycérol, PG), par l'incorporation de groupements activés en position *sn-3*. Ainsi, la MGDG transférase (EC 2.4.1.46) permet d'introduire un UDP-galactose au DAG pour générer du MGDG. Une petite proportion des MGDG est à nouveau glycosylée par une DGDG synthase (EC 2.4.1.241) pour former du DGDG. De la même manière une sulfolipid synthase (EC 3.13.1.1) permet de catalyser l'attachement de l'UDP-sulfoquinovosyl en position *sn-3* du DAG pour former du SQDG. Le PA est également un substrat pour la CDP-DAG synthase (EC 2.7.7.41) qui va produire une forme activée de DAG (cytidine diphosphate-DAG) dont l'énergie de liaison est nécessaire à l'attachement d'un G-3-P en position *sn-3* pour la formation de phosphatidylglycérol phosphate (PGP). Le PGP est ensuite déphosphorylé par une PGP phosphatase (EC 3.1.3.27) pour donner du PG.

Les AG qui composent les différents glycérolipides formés sont caractérisés par un haut degré d'insaturations introduites par les différentes fatty acid desaturases (FAD6, FAD7

et FAD8 ; EC 1.14.19) pour générer des AG poly-insaturés (PUFA) nécessaires au bon fonctionnement des plastes (Wallis & Browse, 2002).

Les membranes des plastes sont ainsi composées principalement de MGDG, DGDG, PC, PG et de SQDG. L'analyse des glycérolipides composant les membranes plastidiales montrent qu'ils ne sont pas uniquement d'origine procaryotique, mais qu'une partie provient également de la voie eucaryotique. D'ailleurs, la membrane plastidiale externe contient une forte proportion de phosphatidylcholine (PC) qui serait exclusivement issue de la voie eucaryotique.

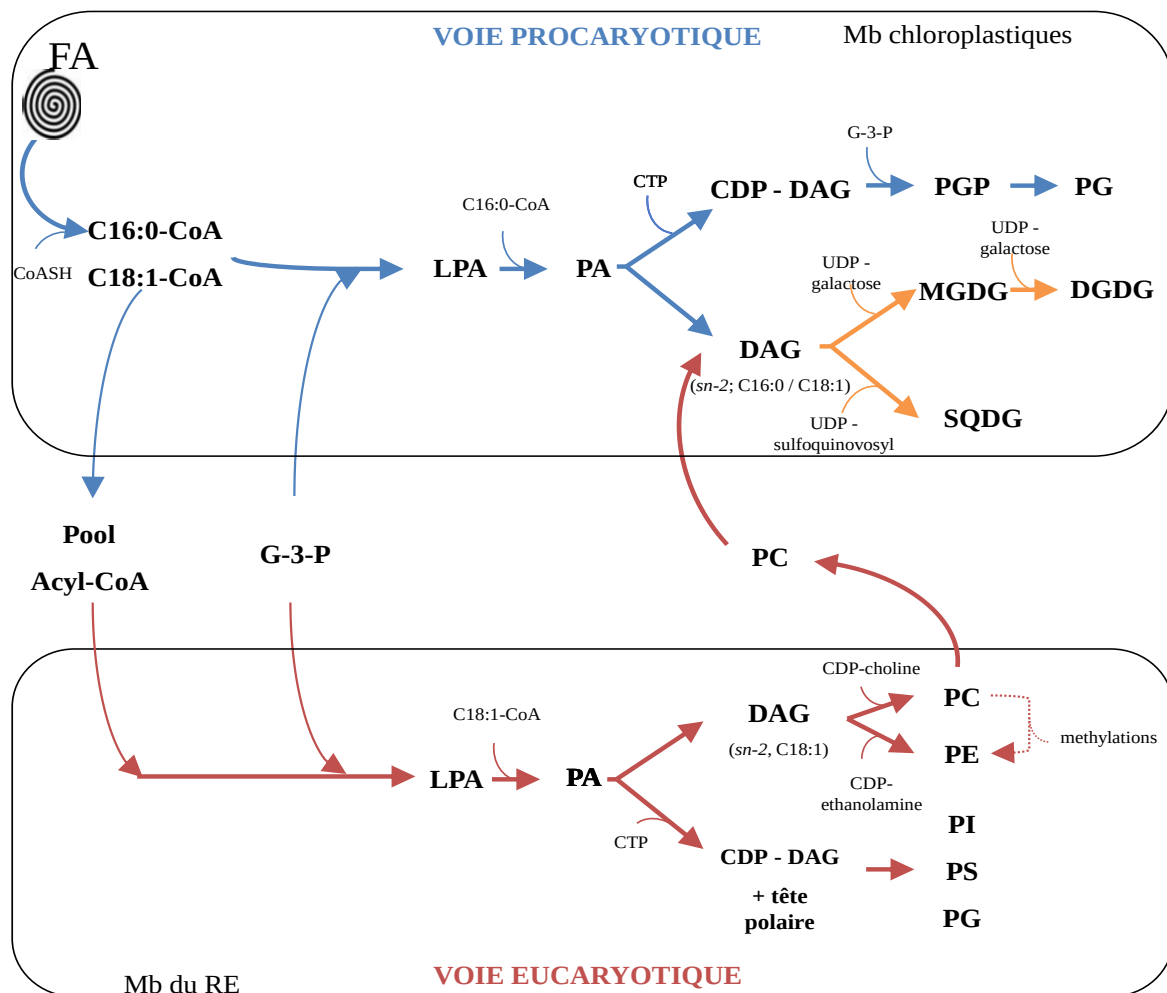


Figure 4 Schéma représentant la synthèse des glycérolipides dans les chloroplastes et le RE. Abréviations : **CDP-DAG**, cytidine diphosphate diacylglycérol ; **CTP**, cytidine triphosphate ; **DAG** , diacylglycérol ; **DGDG**, digalactosyldiacylglycérol ; **G-3-P**, glycérol-3-phosphate ; **LPA**, lysophosphatidic acid ; **MGDG**, monogalactosyldiacylglycérol ; **PA**, phosphatidic acid ; **PC**, phosphatidylcholine ; **PE**, phosphatidyléthanolamine ; **PG**, phosphatidylglycérol ; **PI**, phosphatidylinositol ; **PS**, phosphatidylsérine ; **SQDG**, sulfoguinovosyldiacylglycérol ; **UDP**, uridine diphosphate.

2.1.2.2. La voie eucaryotique

Le RE est le site principal de synthèse des phospho(glycéro)lipides et des triglycérides de réserve, qui dérivent du LPA comme pour la voie procaryotique (Figure 4). Chez la plante, 9 membres de la famille des GPAT ont été mis en évidence. Par élimination et par homologie avec les GPATs animales, la GPAT9 pourrait être un des candidats potentiels impliqués dans la première réaction amenant à la synthèse de LPA de la voie eucaryotique (Gidda *et al.*, 2009). Au cours de la deuxième réaction, la lysophosphatidic acid acyl-transférase cytosolique (LPAAT2) intègre spécifiquement un acide oléique en position *sn*-2 du LPA (Kim & Huang, 2004 ; Kim *et al.*, 2005), ce qui constitue la signature spécifique des glycérolipides issus de la voie eucaryotique.

Sous l'action d'une PAP, le groupement phosphate en position *sn*-3 du PA est éliminé pour former *de novo* un DAG. La PC et la phosphatidyléthanolamine (PE) sont synthétisées à partir de l'attachement sur le DAG de l'aminoalcool correspondant (choline ou éthanolamine), activé au préalable avec une cytidine triphosphate (CTP) par action des CTP : phospho-choline/éthanolamine cytidyl-transferase (EC 2.7.7.14-15). A partir de **S- adénosylméthionine**, la PE-methyl-transferase (PEMT ; EC 2.1.1.17) peut également catalyser une triple transméthylation du PE pour former du PC. En parallèle, le PA est un substrat possible pour la CDP-DAG synthase, qui est converti en l'intermédiaire activé CDP-DAG dont l'attachement de groupements polaires inositol, sérine et glycérol servira à la synthèse de phosphatidylinositol (PI), phosphatidylserine (PS) et de PG.

D'autre part, les PC formées peuvent être converties en DAG par action de la phosphatidylcholine : diacylglycérol cholinephospho-transferase (PDCT ; EC 2.7.8.2) et retourner dans les plastes pour intégrer le pool de DAG plastidiales et contribuer de façon égale à la synthèse des MGDG, DGDG et SQDG (Somerville & Browse, 1991 cités par Ohlrogge & Browse, 1995). Une expérience de radiomarquage sur des feuilles d'*Arabidopsis* réalisée par Browse *et al.* en 1986 a permis d'estimer le flux d'AG entre la voie procaryotique et la voie eucaryotique. D'après ces données, 40 % des AG nouvellement synthétisés au niveau du chloroplaste alimenteraient la voie procaryotique et 60 % seraient exportés vers la voie eucaryotique. Ces derniers subiraient des désaturations au niveau du RE et la moitié de ce pool d'AG retournerait dans le chloroplaste pour contribuer à la synthèse de glycérolipides composant les membranes plastidiales.

Ce dernier correspond à un cycle de désacylation-réacylation de la PC qui permet d'échanger des acyles présents sur la PC avec des AG activés prélevés au niveau d'un pool cytosolique d'acyl-CoA libres. Le C18:1 nouvellement exporté pourrait être incorporé dans la LPC via la LPCAT2 (lysophosphatidylcholine acyl-transférase 2 ; EC 2.3.1.23) où il peut notamment constituer le substrat séquentiel des désaturases FAD2 et FAD3 (EC 1.14.19) pour former des AG modifiés (insaturés, méthylés, cyclopropaniques, polyinsaturés...). A nouveau, par la réaction inverse de la LPCAT2 ou par l'action de la phospholipase A (EC 3.1.1.4), les AG modifiés sont libérés et peuvent intégrer le pool d'acyl-CoA cytosolique pour servir à la synthèse des glycérolipides. Une étude récente a montré que les mutants déficients pour les gènes *LPCAT1* et *LPCAT2* ont des teneurs réduites en AG poly-insaturés (PUFA) dans les TAG (Bates *et al.*, 2012). De plus, le triple mutant *reduced oleate desaturation1/lpcat1/lpcat2* montre une réduction drastique dans les teneurs en PUFA au sein de la graine, ne représentant qu'un tiers des teneurs normalement présentes chez le type sauvage. Ces données indiquent que le mécanisme d'acyl-editing contrôle une grande partie du flux d'AG pour former les PUFA composant les glycérolipides d'origine eucaryotique, dont les TAG.

2.1.3. Synthèse des lipides de réserve : les triglycérides

Les TAG sont des lipides neutres et constituent le composant majoritaire de l'huile des graines oléagineuses. Ces lipides de réserve représentent la source principale de carbones et d'énergie mobilisée durant la germination. D'autres tissus peuvent également accumuler des TAG, tels que les feuilles en sénescence ou les grains de pollen (Kaup *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2002). Leur biosynthèse a lieu au niveau de la membrane du RE pendant la phase d'accumulation des réserves après l'embryogenèse. Les TAG résultent de l'estérification en position *sn*-3 du DAG d'un AG provenant de la réserve d'acyl-CoA cytosolique, par action de la diacylglycérol acyl-transférase (DGAT ; EC 2.3.1.20) ou de la phospholipid : diacylglycérol acyl-transférase (PDAT ; EC 2.3.1.158) (Zhang *et al.*, 2009). L'accumulation des TAG au niveau de la bicouche lipidique induirait une distorsion de la membrane et la formation d'oléosomes entourés par une monocouche de phospholipides et de protéines majoritairement représentées par l'oléosine (Napier *et al.*, 1996).

2.2. Catabolisme des AG lors du développement post-germinatif

Les lipides de réserve des graines oléagineuses sont convertis en glucide rapidement après le début de la germination, afin d'assurer la fourniture en énergie et en carbone lors de la phase transitoire hétérotrophe (Quettier & Eastmond, 2009). La lipolyse des TAG libère des AG qui sont activés en acyl-CoA dans le cytosol et sont importés dans le glyoxysome où ils sont dégradés par la β -oxydation (Figure 6). Les acétyl-CoA formés alimentent le cycle glyoxylique qui produit du succinate. Ce composé est ensuite transporté dans la mitochondrie pour alimenter le cycle TCA et le malate produit, constitue un substrat potentiel de la néoglucogénèse localisée au niveau du cytosol.

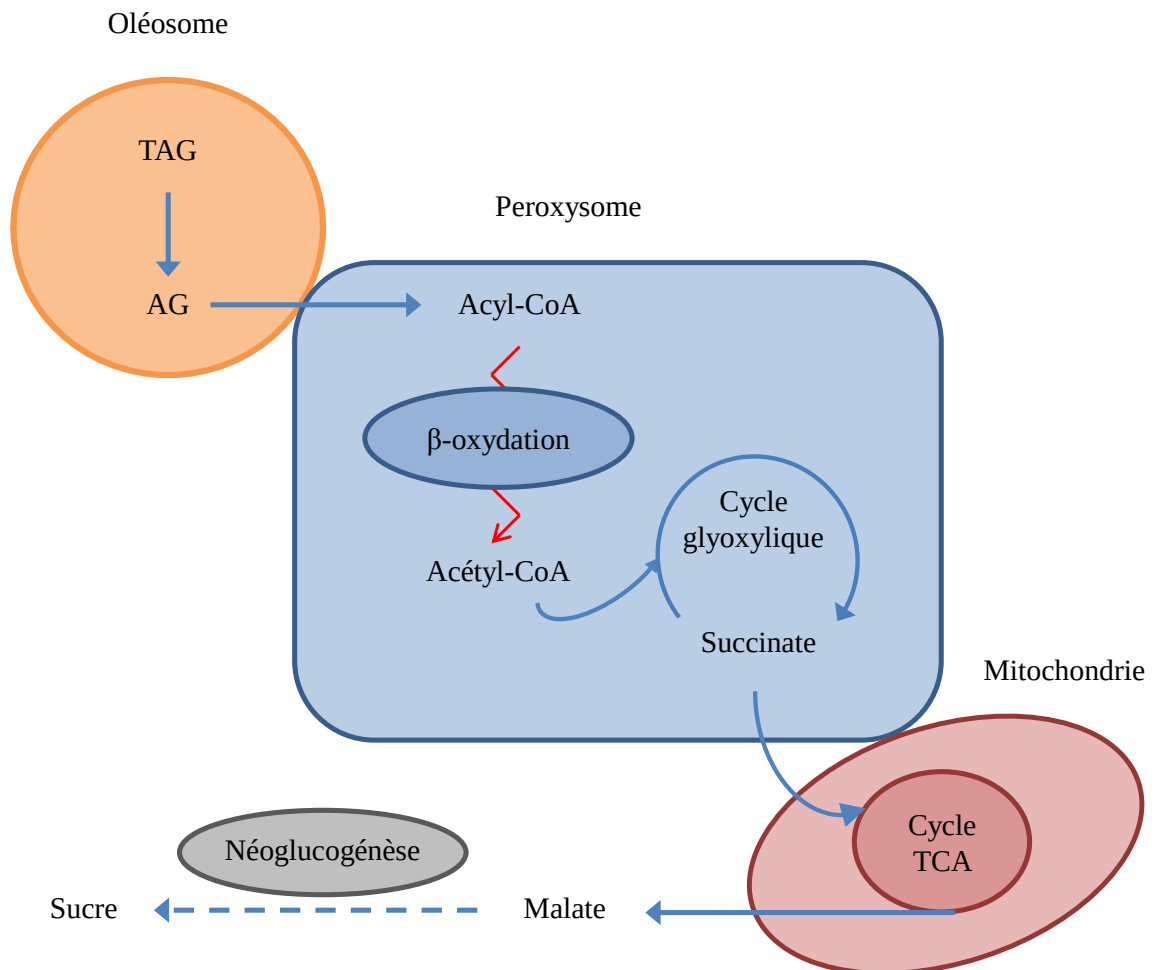


Figure 6 Schéma simplifié de la mobilisation des TAG au cours de la germination et post-germination d'Arabidopsis (adapté de la thèse B. Bourdin, 2007). Abréviations : **AG**, acide gras ; **TAG**, triacylglycérol ; **TCA**, tricarboxylic acid cycle.

2.2.1. Lipolyse des TAG

Les lipases présentes à la surface des oléosomes hydrolysent les TAG en glycérol et en AG (Quettier & Eastmond, 2009). L'accès des lipases aux TAG pourrait être facilité par l'intervention de protéases et de phospholipases (Bhatla *et al.*, 2009). Le glycérol est transféré vers le cytosol où il est phosphorylé pour former du G-3-P. Ce composé est ensuite oxydé en dihydroxyacetone phosphate (DHAP) qui est un substrat possible pour la néoglucogenèse. Les AG libérés par la lipolyse sont transportés dans le peroxyosome via un transporteur de type ABC, la protéine COMATOSE (Footfitt *et al.*, 2002) et sont activés en esters de CoA par les LACS6/LACS7 (Fulda *et al.*, 2004) pour être dégradés par la β -oxydation.

2.2.2. β -oxydation peroxysomal des acyl-CoA

Les plantes sont capables de dégrader complètement les acyl-CoA en acétyl-CoA dans le peroxyosome. En effet, chaque cycle de β -oxydation entraîne un raccourcissement de l'acyl-CoA de deux carbones, et forme une molécule d'acétyl-CoA. Un cycle nécessite l'intervention séquentielle d'enzymes spécifiques : l'acyl-CoA oxidase (ACX ; EC 1.3.3.6), la protéine multifonctionnelle (MFP) et la ketoacyl-CoA thiolase (KAT ; EC 2.3.1.16) qui vont respectivement catalyser l'oxydation, l'hydratation/déshydrogénation et le clivage thiolytique, (Graham & Eastmond, 2002). L'étude de mutants affectés dans la β -oxydation peroxysomale, montre que cette dernière est également impliquée dans la modification d'acyl-CoA en composés signaux tels que l'acide indole-3-butyrique et l'acide jasmonique (Theodoulou *et al.*, 2005).

Chez la plante, le catabolisme des AG serait uniquement localisé dans le peroxyosome, mais quelques études relatent l'existence d'une β -oxydation mitochondriale à l'instar du règne animal (Dieuaide *et al.*, 1993 ; Masterson & Wood, 2000a et 2009). Toutefois Graham & Eastmond (2002) rapportent que des études comme celles menées par Hoppe & Theimer (1997) réfutent cette hypothèse. Les auteurs ont notamment isolés des glyoxyomes et des mitochondries de graines de colza en germination. La recherche d'activités enzymatiques propres à la β -oxydation mitochondriale indique que la fraction mitochondriale est dépourvue d'activité acyl-CoA deshydrogenase (ACDH) qui est l'enzyme qui catalyse la première réaction de la β -oxydation mitochondriale. En revanche, les enzymes impliquées dans la dégradation des AG saturés ont été mises en évidence dans la fraction glyoxysomale par

mesures d'activités enzymatiques associées ou par Western blots. Les auteurs ont donc conclu que les mitochondries ne sont pas impliquées dans le catabolisme des AG et que l'activité résiduelle de β -oxydation trouvée dans les mitochondries serait liée à une contamination de glyoxysomes. Pourtant, les données provenant d'études métaboliques réalisées sur des racines de maïs (Dieuaide *et al.*, 1993), la purification et la caractérisation d'activités enzymatiques de type ACDH à partir d'embryon de graine de tournesol en développement post-germinatif, (Bode *et al.*, 1999) plaident en faveur de l'existence d'une β -oxydation mitochondriale. Par ailleurs la mesure d'activités carnitine acyl-transférases dans des mitochondries issues de plantes (Thomas & Wood, 1986 ; Schwabedissen-Gerbling & Gerhardt, 1995) indiquerait que, comme chez l'animal, cette voie métabolique de dégradation de lipides dépendrait d'un système d'importation mitochondriale des AG faisant intervenir la carnitine (Masterson & Wood, 2000a). La β -oxydation mitochondriale serait active en fonction du stade de développement, du type tissulaire, lors du recyclage des lipides, de la synthèse de lipides particuliers, ou encore dans des conditions spécifiques de stress, comme une carence en glucose (Dieuaide *et al.*, 1993 ; Graham & Eastmond, 2002 ; Masterson & Wood, 2009).

2.2.3. Cycle glyoxylique et néoglucogenèse

Les acétyl-CoA provenant de la β -oxydation peroxysomale sont métabolisés par le cycle glyoxylique pour former des acides organiques à 4 carbones (succinate et oxaloacetate ; Graham & Eastmond, 2002). Le cycle glyoxylique est une forme modifiée du cycle TCA qui se distingue par la présence de deux enzymes spécifiques : l'isocitrate lyase (ICL ; EC 4.1.3.1) et la malate synthase (EC 2.3.3.9) (Figure 7). Ces deux enzymes permettent de contourner les 2 étapes de décarboxylation présentes dans le cycle TCA et évitent ainsi la perte de carbones sous la forme de CO_2 . L'enzyme ICL clive l'isocitrate en succinate (C4:0) et en glyoxylate (C2:0). D'une part, le succinate alimente le cycle TCA et contribue à la formation d'oxaloacétate qui est converti en phosphoénolpyruvate (PEP) pour la synthèse de sucres par néoglucogenèse. D'autre part, le glyoxylate est condensé avec de l'acétyl-CoA par la MS pour former à nouveau du malate (C4:0), qui est modifié en oxaloacetate pour reconstituer le cycle glyoxylique.

La forme sous laquelle l'acétyl-CoA est acheminé vers la mitochondrie dans le cadre de cette respiration directe des lipides n'est pas encore définitivement établie. Des études chez *Arabidopsis* montrent que l'acétyl-CoA est transformé en citrate dans le peroxysome par une

citrate synthase peroxisomale (CSY ; EC 2.3.3.1 ; Pracharoenwattana *et al.*, 2005), puis transporté dans la mitochondrie pour intégrer le cycle TCA (Figure 7). Chez la levure, la suppression de l'activité de CSY n'a pas d'effet sur la respiration directe des lipides grâce au transport d'acétyl-CoA dans les mitochondries sous la forme d'acétyl-carnitine (van Roermund *et al.*, 1995 et 1999).

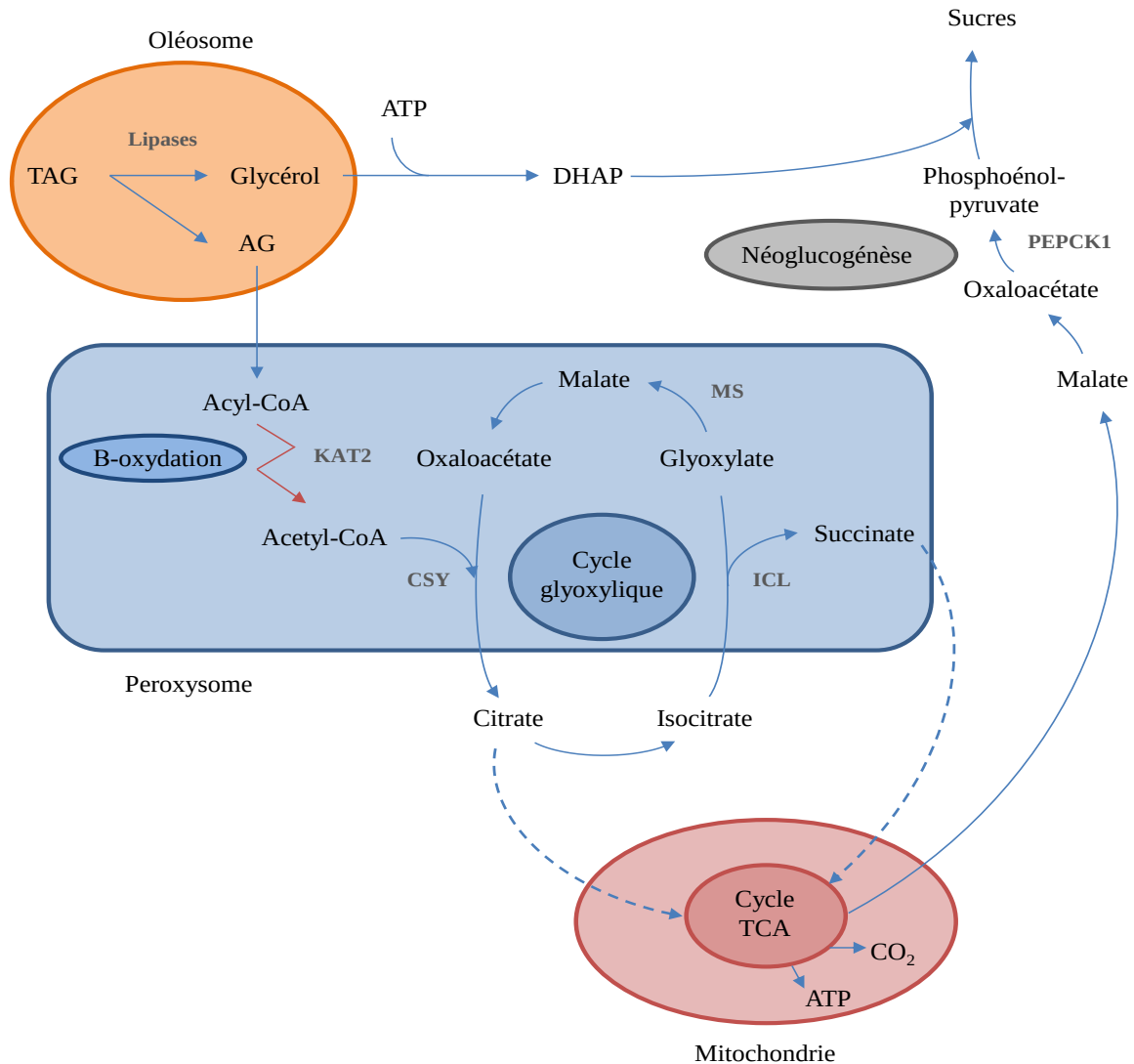


Figure 7 Représentation schématique du rôle du cycle glyoxylique et du cycle TCA dans la mobilisation des lipides de réserve au cours de la germination et post-germination d'*Arabidopsis* (adaptée de la thèse de B. Bourdin, 2007). Abréviations : **ATP**, adenosine triphosphate ; **CSY**, citrate synthase ; **DHAP**, dihydroxyacetone phosphate ; **KAT2**, ketoacyl-CoA thiolase 2 ; **ICL**, isocitrate lyase ; **MS**, malate synthase ; **PEPCK1**, phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 ; **TAG**, triacylglycérol ; **TCA**, tricarboxylic acid cycle.

Chez les plantes, la phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (PEPCK1 ; EC 4.1.1.32) contribuerait au moment de la post-germination non seulement à l'utilisation des TAG mais aussi à celle des protéines comme substrats alternatifs de la néoglucogenèse (Rylott *et al.*, 2003). Les mutants affectés au niveau de l'expression et de l'activité de la PEPCK1 sont également perturbés dans l'établissement de la post-germination chez *Arabidopsis*. Contrairement au cycle glyoxylique, la néoglucogenèse apparaît essentielle au développement post-germinatif chez *Arabidopsis* (Rylott *et al.*, 2003 ; Figure 7).

2.3. Le recyclage des lipides lors de la sénescence

Au cours de la sénescence naturelle, l'activité anabolique est largement réduite et le catabolisme de macromolécules telles que les protéines, les glucides, les lipides et les acides nucléiques est accru. Les nutriments ou précurseurs formés permettent d'alimenter les organes en croissance (Yang & Ohlrogge, 2009). Dans le cas des lipides, la dégradation des systèmes membranaires des feuilles et des fleurs s'accompagne d'un enrichissement en AG libres dans les organes en sénescence. Ces derniers seraient remobilisés et métabolisés par la β -oxydation. La comparaison par microarray de l'expression de gènes entre des jeunes feuilles et des feuilles en sénescence, a montré une surexpression de gènes impliqués dans la dégradation des lipides. Ainsi, *LACS6*, *LACS7*, *ACX1*, *ACX2* et *KAT2* qui interviennent dans le processus de β -oxydation sont en moyenne 2 fois plus exprimés dans les feuilles en sénescence. Pourtant, l'étude de mutants d'*Arabidopsis* perte-de-fonction *acx1acx2*, *lacs6lacs7* et *kat2* montre un profil et un taux de dégradation des AG totaux similaires au type sauvage WS au cours de la sénescence de feuilles. Ces données suggèrent que le taux de β -oxydation pourrait être faible dans les feuilles en sénescence, permettant à d'autres gènes homologues appartenant à la famille des *ACX*, *LACS* et *KAT*, de compenser la perte d'expression des gènes mutés (Yang & Ohlrogge, 2009).

2.4. Composition lipidique de certains organes et organites chez *Arabidopsis*

Les feuilles présentent de fortes teneurs en glycolipides (MGDG, DGDG) et peu de phosphoglycolipides comme la PE, la PI et la PS, bien que la PC et le PG soient assez bien représentés (Tableau 1). La prépondérance de glycolipides dans les feuilles est liée à l'abondance en chloroplastes dans les organes photosynthétiques. Ces glycolipides sont synthétisés au niveau de la membrane interne et externe des plastides, par les voies procaryotique et eucaryotique, et peuvent être ensuite transportés par des

mécanismes encore mal connus vers les thylakoïdes. Les MGDG, DGDG, PG et SQDG sont essentiels à l'élaboration des membranes des thylakoïdes et à la stabilité des complexes photosynthétiques (Benning, 2009). La PC est quant à elle uniquement présente dans la membrane externe des chloroplastes. Comme la majorité des organes et des tissus non photosynthétiques, les racines contiennent en grande majorité (à plus de 86 %) des phosphoglycérolipides d'origine eucaryotique (PC, PE, PI+PS). Ces derniers participent fortement à l'élaboration des membranes lipidiques des organites tels que les mitochondries (Caiveau *et al.*, 2001 ; Jouhet *et al.*, 2004-2007). Enfin, la cardiolipine (CL ou diphosphatidylglycérol) est un lipide particulier de la membrane interne des mitochondries. Elle est essentielle au fonctionnement optimal de nombreuses protéines impliquées notamment dans le métabolisme énergétique mitochondrial dont la phosphorylation oxydative (Schlame & Ren, 2009).

Classe de glycérolipides	Feuilles	Racines	Chloroplastes	Extrachloroplastes	Mitochondries
PC	13,8	45,4	12	47,8	44,2
PE	7,1	27,5	–	36,5	37,1
PI+PS	3,1	12,9	–	10,9	4,15
PA	0,7	–	–	–	–
CL	–	–	–	–	10,6
MGDG	43,2	3,4	53,7	–	1,4
DGDG	18,6	2	20,9	–	1,5
PG	13,5	3,8	9,5	4,4	2,5
SQDG	–	–	3,9	–	–

Tableau 1 Composition en glycérolipides de certains organes et organites chez *Arabidopsis* (Représentation en pourcentage de glycérolipides totaux mesurés ; adaptée de Li-Beisson *et al.*, 2010).

2.5. Modulation du métabolisme lipidique lors de stress

Pour faire face aux variations environnementales, la plante met en place des ajustements d'ordres morphologique, métabolique et biochimique. Lors d'une exposition

prolongée au froid ou d'une carence en phosphate, la plante va moduler notamment la composition lipidique de ses membranes cellulaires pour mieux s'adapter à son environnement et survivre en condition de stress.

2.5.1. Réponse de la plante à une exposition prolongée au froid

De nombreuses espèces de plantes des régions tempérées peuvent augmenter leur tolérance à des températures basses. Ce processus, appelé acclimatation au froid, induit des changements d'ordre biochimique et physiologique. Des analyses génétiques ont révélé que plusieurs gènes sont impliqués dans l'acclimatation au froid et notamment la famille de gènes *C-REPEAT/DRE BINDING FACTOR* incluant *CBF1*, *CBF2*, *CBF3* (Zarka *et al.*, 2003). Ces gènes sont surexprimés précocement après 15 min d'exposition au froid et induisent la synthèse de facteurs de transcription qui vont déclencher les modulations métaboliques nécessaires à la tolérance au froid. Plusieurs mécanismes semblent contribuer à l'acclimatation au froid, y compris la synthèse de polypeptides cryoprotecteurs, comme *COLD-REGULATED 15a* (*COR15a* ; Artus *et al.*, 1996) et l'accumulation de solutés compatibles qui ont des propriétés cryoprotectrices, tels que la proline, le sucrose, le raffinose et la glycine bêtaïne (Nanjo *et al.*, 1999 ; Taji *et al.*, 2002 ; Park *et al.*, 2004). En parallèle, une partie des AG composant les lipides membranaires est désaturée pour rétablir la fluidité des membranes. Ces AG sont majoritairement des diénoïques convertis en triénoïques par des désaturases de type *FAD7* et *FAD8* localisées dans les plastes et *FAD3* au niveau du RE (Upchurch, 2008 ; Shi *et al.*, 2010). De l'acide linoléique (C18:2) est également libéré des membranes pour former des composés signaux de type oxylipines, tels que le jasmonate, qui vont contribuer à la résistance au froid (Upchurch, 2008).

2.5.2. Réponse de la plante lors d'une carence en phosphate

Le phosphate occupe un rôle essentiel à la physiologie de la plante (phosphorylation oxydative, phosphorylation des nucléotides, des protéines, intermédiaires métaboliques...) et une quantité limitante en ce composé a des répercussions majeures sur le métabolisme et le développement. Lors d'une carence en phosphate, la plante met en place des réponses locales et systémiques qui vont lui permettre de (re)mobiliser et/ou d'économiser le phosphate nécessaire à son métabolisme.

La plante modifie son système racinaire pour augmenter sa surface d'échange avec le sol et améliorer l'absorption de phosphates inorganiques (Péret *et al.*, 2011). Pour améliorer la disponibilité des composés phosphatés dans le sol, les racines excrètent des acides organiques (citrate, malate) et des enzymes de type phosphatase ou ribonucléase pour mobiliser les ions phosphates piégés dans le sol (Hammond *et al.*, 2004). La plante ajuste également son métabolisme intracellulaire en mettant en place des réactions métaboliques non consommatrices de phosphate c'est-à-dire non dépendantes de l'ATP (Hammond *et al.*, 2004), ou en activant des transporteurs à haute affinité pour le phosphate inorganique (Karthikeyan *et al.*, 2002).

D'autre part, les membranes cellulaires sont riches en phospholipides et sont par conséquent une réserve importante en phosphate. Au cours d'une limitation en phosphate, des glycérolipides non phosphorylés vont substituer les phosphoglycérolipides dans la membrane des thylakoïdes mais aussi dans les membranes extraplastidiales (Benning, 2009). Ainsi, une partie des SQDG assemblés au niveau de la membrane interne des plastes remplacerait le PG de la membrane des thylakoïdes (Essigmann *et al.*, 1998 ; Yu & Benning, 2003). En effet, le SQDG et le PG sont des composés anioniques et ont la même capacité à former des bicouches lipidiques. D'autre part, Benning (2009) rapporte que le glycérolipide DGDG qui possède les mêmes propriétés de structure que la PC (lipide neutre formant des bicouches) va substituer en particulier cette dernière dans les membranes extraplastidiales, les mitochondries, le tonoplaste, la membrane plasmique et la membrane péribactéroïde chez les légumineuses.

Ainsi, lors d'une carence en phosphate, les organites et leurs membranes présentent un profil particulier et caractéristique en lipides. Ces derniers ne sont pas toujours synthétisés au sein même de la membrane, mais peuvent être issus de différents types de mécanismes d'importation et de transport intracellulaire.

2.6. Transport intracellulaire des lipides

Les études réalisées sur des cellules de mammifères et sur des levures ont permis d'améliorer les connaissances actuelles sur les mécanismes biochimiques et moléculaires concernant le transport intracellulaire des lipides. Chez la plante, les connaissances sont

limitées, mais les mécanismes de transport des lipides pourraient être classés sous différentes formes (Figure 8).

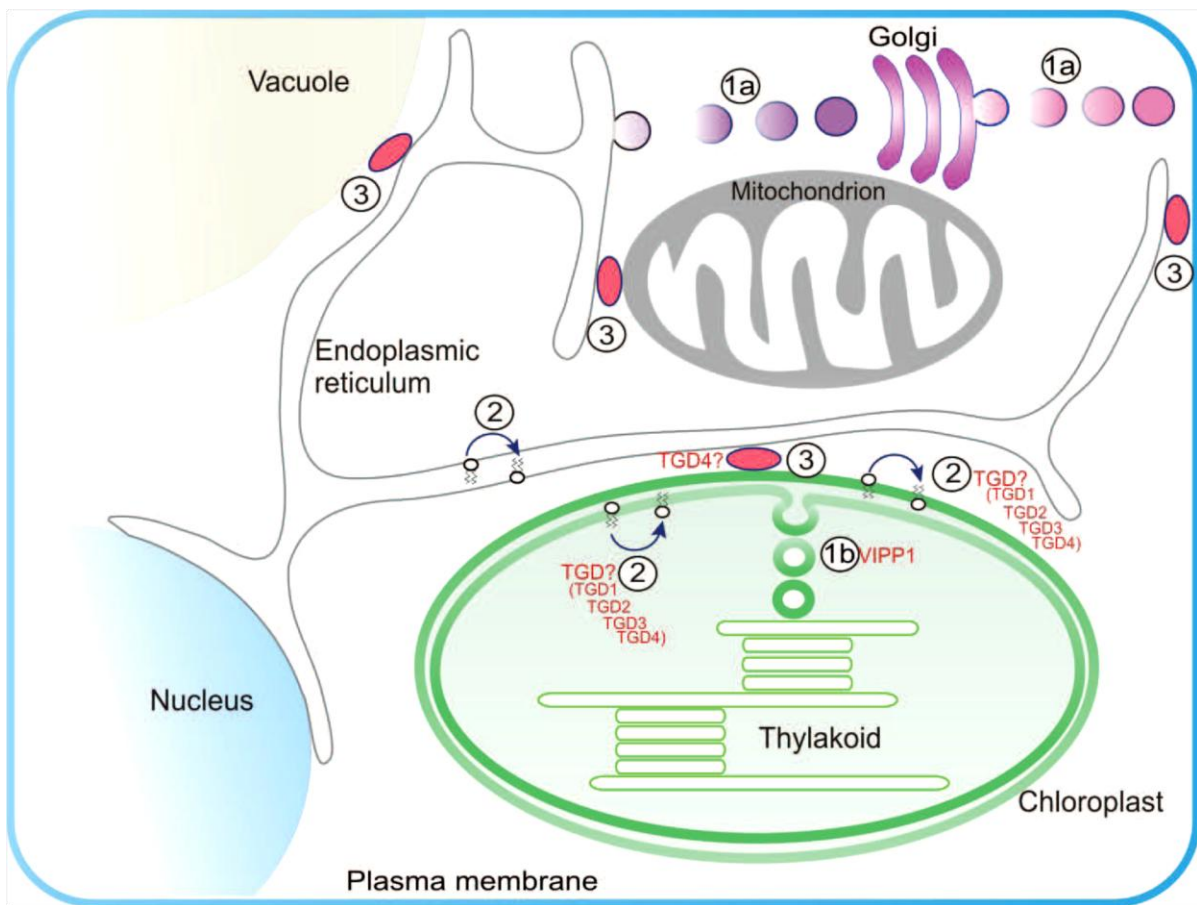


Figure 8 Schéma représentant les formes potentielles de transports intracellulaires des lipides chez *Arabidopsis* (extrait de Li-Beisson *et al.*, 2010), par transport vésiculaire (**1a** et **1b**), par mouvement flip flop (**2**) et par contact direct entre les membranes des organites (**3**). Abréviations : **TGD**, trigalactosyldiacylglycerol ; **VIPP1**, vesicle inducing protein in plastids.

2.6.1. Transfert de lipides par contact direct entre les membranes des organites

Chez la plante, des interactions entre les membranes des différents organites ont été observées (Figure 8, mécanisme 3 ; Li-Beisson *et al.*, 2010). Différentes études ont montré l'existence d'un continuum entre le RE et d'autres compartiments subcellulaires tels que les plastides, les mitochondries, la membrane plasmique, la membrane nucléaire et le tonoplaste (Staehelin, 1997). Bien que les mitochondries possèdent également des enzymes nécessaires à la biosynthèse des phospholipides, des données génétiques et biochimiques suggèrent que la

biogenèse des membranes mitochondriales dépend dans une large mesure de l'importation de phospholipides à partir du RE (Nerlich *et al.*, 2007 ; Jouhet *et al.*, 2007). A l'heure actuelle, le transfert direct de lipides reste encore mal défini, mais l'inactivation de la protéine trigalactosyldiacylglycerol 4 (TGD4) bloquerait le transfert de PA entre le RE et les plastes (Xu *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2012).

2.6.2. Transport vésiculaire

Dans les cellules eucaryotes, le transport sous forme de vésicules joue un rôle essentiel dans le transfert de protéines et de lipides membranaires entre les organites et au sein même des organites, via le bourgeonnement et la fusion de vésicules membranaires (Jouhet *et al.*, 2007 ; Figure 8, mécanisme 1a). Par une analyse mutationnelle chez *Arabidopsis* et chez une cyanobactérie, il a été montré que la mutation d'un seul gène appelé *VIPP1* (Vesicle Inducing Protein In Plastids 1) perturbe en concomitance, la synthèse de la membrane thylakoïdienne et la formation de vésicules (Kroll *et al.*, 2001 ; Westphal *et al.*, 2001a). De plus, Westphal *et al.* (2001b) ont montré par microscopie électronique et par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la formation et de la fusion vésiculaire membranaire, que le transport vésiculaire est également existant dans les plastes. Ces données confondues suggèrent que ce type de mécanisme serait également impliqué dans le transfert de lipides de la membrane interne du chloroplaste vers la membrane des thylakoïdes (Figure 8, mécanisme 1b).

2.6.3. Transport par mouvement flip flop

Le déplacement des phospholipides d'un feuillet à l'autre des membranes est appelé mouvement flip flop (Figure 8, mécanisme 2). Ce phénomène n'est pas spontané, mais nécessite l'intervention de 2 types d'enzymes, les flippases qui catalysent le transfert libre de lipides et des translocases qui hydrolysent l'ATP pour déplacer certains lipides contre un gradient de concentration (Jouhet *et al.*, 2007).

Les flippases généreraient à leur surface un environnement polaire qui favoriserait le déplacement libre et rapide de lipides entre les deux feuillets d'une membrane. La protéine RFT1 est la première flippase à avoir été caractérisée chez les organismes eucaryotes et plus particulièrement chez la levure. RFT1 permet de catalyser le transfert de dolichol (terpénoïde) du feuillet cytosolique où il est synthétisé vers le feuillet interne du RE. A ce jour, aucune

flippase n'a encore été identifiée chez les plantes, mais des candidats ont été proposés par homologie de séquence avec des flippases d'autres organismes. Ce type de mouvement pourrait également intervenir dans le transfert de lipides situés au niveau des zones de contact entre 2 organites. Ainsi, lors d'une carence en phosphate certains lipides tels que le DGDG pourraient être transférés par ce mécanisme au niveau des zones de contact entre les feuillettes externes des chloroplastes et des mitochondries (Jouhet *et al.*, 2004). Les flippases permettent ainsi de maintenir la symétrie de la double couche de phospholipides des membranes, contrairement aux translocases énergie dépendante qui peuvent accumuler spécifiquement des lipides et contribuer à une répartition asymétrique des lipides entre les 2 feuillettes membranaires.

Chez la plante, un complexe de transporteurs ABC constitué de TGD1, 2, 3 a été identifié et joue le rôle de translocase. Ces protéines seraient localisées au niveau de la membrane interne des chloroplastes et catalyseraient le transfert de PA du RE vers les plastes. TGD1 contient plusieurs domaines transmembranaires et correspondrait à la perméase du complexe (Wang *et al.*, 2012). TGD2 prendrait en charge spécifiquement le PA et TGD3 est une enzyme de type ATPase. Dernièrement, il a été démontré que TGD4 comme TGD2 a également pour substrat préférentiel le PA. TGD4 serait ancrée dans la membrane externe du chloroplaste et participerait au transfert de lipides polaires (majoritairement le PA) du RE vers le chloroplaste et/ou de PA à travers la membrane externe du chloroplaste (Wang *et al.*, 2012).

2.6.4. Trafic intracellulaire des AG

Le trafic intracellulaire des AG dans la cellule végétale est également hypothétique. Des études *in vitro* menées sur des membranes lipidiques pures ont montré que les coefficients de perméabilité pour les AG à longue chaîne sont relativement élevés, ce qui suggère que les protéines ne sont pas nécessairement requises pour faciliter le transfert des AG à travers les membranes cellulaires (Kamp & Hamilton, 2006). Cependant, d'autres études mettent en évidence des enzymes favorisant la prise en charge, l'activation et le transport transmembranaire des AG.

Chez les plantes, les AG libres sont détectés à des niveaux très faibles après synthèse car ils sont réactivés très rapidement au coenzyme A par des enzymes de type LACS (Schnurr *et al.*, 2002 ; Aznar-Moreno *et al.*, 2014) pour alimenter notamment la synthèse lipidique de la

voie eucaryotique. La caractérisation lipidique de mutants thioesterases, enzymes en charge de l'hydrolyse des acyl-ACP, révèle des modifications de la composition des lipides en AG qui montrent un rôle déterminant de ces enzymes dans le type d'AG exportés du plaste (Salas & Ohlrogge, 2002 ; Bonaventure *et al.*, 2003 ; Moreno-Pérez *et al.*, 2014). A ce jour aucun transporteur plastidial favorisant le transfert d'AG libres ou activés du plaste vers le cytosol n'a encore été identifié. De la même manière, aucune enzyme impliquée dans l'importation d'AG dans le RE ou dans la mitochondrie n'a encore été mise en évidence. En revanche, Footfitt *et al.* (2002) ont montré qu'un transporteur de type ABC, la protéine COMATOSE, permettait d'importer des acyl-CoA à longue chaîne dans le peroxysome pour alimenter la β -oxydation. Chez la plante, il existe un nombre important de transporteurs ABC putatifs (Rea, 2007) et la caractérisation de transporteurs ABC associés à l'enveloppe des différents organites pourraient être prometteuse.

Le métabolisme des AG et des glycérolipides qui en découlent, fait appel à des systèmes enzymatiques très spécifiques et compartimentés, ce qui implique des mécanismes de transport lipidiques entre ces différents compartiments cellulaires. Les enzymes participant aux processus de biosynthèse et de modification des AG dans les cellules végétales ont fait l'objet de nombreuses études et sont maintenant bien caractérisées (Li-Beisson *et al.*, 2010). En revanche, certaines incertitudes persistent quant aux systèmes en charge du trafic intracellulaire des AG. Chez les mammifères et la levure, les fonctions biologiques de la carnitine sont bien définies et cet acide aminé occupe un rôle essentiel dans le transport intracellulaire des AG. Chez la plante, la présence de carnitine, d'acyl-carnitines et des activités enzymatiques associées ont été démontrées dans différents organites tels que les mitochondries et les plastes. Ces données suggèrent un lien entre la carnitine et le métabolisme des lipides chez la plante, dont un rôle possible dans la prise en charge des AG à l'instar des mammifères et des levures.

3. LA CARNITINE DANS LE METABOLISME ANIMAL ET MICROBIEN

3.1. Généralités

La carnitine (L-3-hydroxy-4*N,N,N*-triméthylamino-butyrates ; L-carnitine) est un composé ubiquitaire, non protéinogène que l'on retrouve dans tous les règnes vivants. Elle a été découverte au début du XX^{ème} siècle, simultanément par Gulewitsch & Krimberg et Kutscher dans des extraits de muscles squelettiques et la formule chimique de la carnitine ($C_7H_{15}NO_3$) n'a été élucidée par Tomita & Sendju que deux décennies plus tard (Gulewitsch & Krimberg, 1905 ; Kutscher, 1905 ; Tomita & Sendju, 1927 ; cités par Wolf, 2006). La carnitine contient un ammonium quaternaire et existe sous deux formes D- et L-, mais seul le stéréoisomère L-carnitine est biologiquement actif. La carnitine possède également une fonction hydroxyle qui lui permet de s'estérifier à des acides organiques par l'intervention de carnitine acyl-transférases (Figure 9). La carnitine est donc présente sous forme libre et estérifiée, mais la fraction libre est majoritaire. Chez l'humain, 75 % de la carnitine provient de l'alimentation et elle est retrouvée essentiellement dans la viande et d'autres produits issus de l'animal, et à des concentrations moindres dans les végétaux (Tein *et al.*, 1996 ; Bourdin *et al.*, 2007). En parallèle, une partie de la carnitine est issue d'une synthèse endogène, dont la voie de biosynthèse est à présent bien définie chez les mammifères (Vaz & Wanders, 2002) et chez la levure *Candida albicans* (Strijbis *et al.*, 2009).

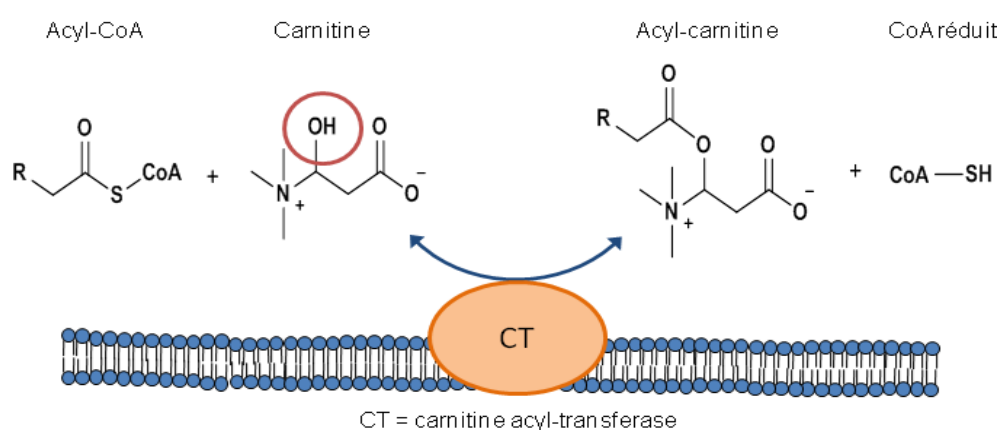


Figure 9 Schéma représentant la réaction d'estérification réversible entre la carnitine et les AG activés au coenzyme A (CoA) catalysée par les carnitines acyl-transférases (CT).

3.2. Biosynthèse de la carnitine

Chez l'animal, la carnitine est synthétisée principalement dans les reins, le foie et le cerveau à partir de la lysine et de la méthionine (Vaz & Wanders, 2002). Le squelette carboné de la carnitine provient de la lysine qui est triméthylée dans le cytosol par une méthyltransférase avec la S-adénosylméthionine comme donneur de groupement CH₃. Il en résulte la formation du 6-*N*-triméthyllysine (TML). Chez les mammifères la TML pourrait également provenir de la dégradation lysosomale ou protéasomale des protéines contenant des lysines *N*-méthylées (Paik & Kin, 1971). D'autre part, une étude récente a montré que la TML est présente en quantité notable chez plusieurs plantes et les auteurs suggèrent que la TML d'origine végétale apportée par l'alimentation serait une meilleure source pour alimenter la voie de synthèse animale de la carnitine que celle qui provient de la dégradation des protéines, plus coûteuse à produire en terme d'énergie (Servillo *et al.*, 2014). La TML subit 4 réactions enzymatiques pour former la carnitine (Figure 10). Au niveau de la membrane mitochondriale externe, la TML hydroxylase (TMLH) hydroxyle la TML pour former du 3-hydroxy-6-*N*-TML (HTML). Le composé résultant est clivé en 4-triméthylaminobutyraldéhyde (TMABA) et en glycine par une HTML aldolase. Le TMABA est ensuite oxydé par une TMABA déshydrogénase (TMABADH) et permet la formation du 4-*N*-triméthylaminobutyrate ou γ -butyrobétaine (BBD ou γ -BB). Enfin, la γ -BB est transformée par la γ -BBD hydroxylase (γ -BBD) en carnitine.

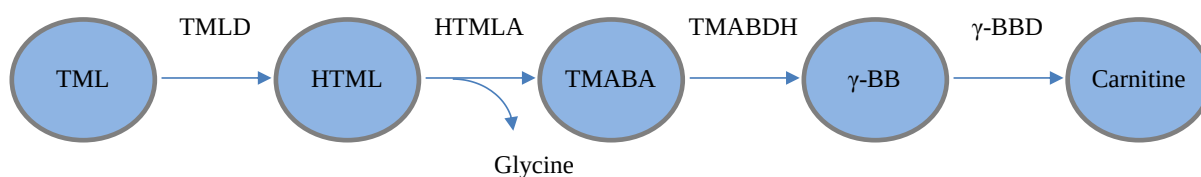


Figure 10 Représentation schématique de la voie de biosynthèse de la carnitine chez les mammifères. Abréviations : γ -butyrobétaine ou γ -BB, triméthylaminobutyrate ; γ -BBD, γ -BB dioxygénase ; HTML, hydroxy-TML ; HTMLA, HTML aldolase ; TMABA, triméthylaminobutyraldéhyde ; TMABADH, TMABA déshydrogénase ; TML, 6-*N*-triméthyllysine ; TMLD, TML dioxygénase.

3.3. Homéostasie de la carnitine

Après ingestion ou synthèse endogène, la carnitine est transportée par la circulation sanguine vers les différents tissus. L'absorption cellulaire de la carnitine est favorisée par un

transporteur de cation organique sodium dépendant (OCTN2) (Tamai *et al.*, 1998). OCTN2 prend en charge la carnitine et les acyl-carnitines à courtes chaînes avec une grande affinité, mais il peut transporter d'autres composés appartenant également à la famille des bétaines (Pochini *et al.*, 2004). Trois autres transporteurs plasmiques, OCTN1, OCTN3 et CT2 présentent une forte homologie de séquence avec OCTN2 et peuvent également contribuer à l'import de la carnitine dans la cellule (Tamai *et al.*, 2000 ; Enomoto *et al.*, 2002).

3.4. Dosage de la carnitine et des acyl-carnitines

La quantification de la carnitine peut être effectuée par différentes méthodes enzymatiques ou par des techniques séparatives couplées à la spectrométrie de masse. Ainsi, le dosage de la carnitine libre a été réalisé dans des tissus de rat et des fluides humains par dosages enzymatiques (spectrophotométriques ou radioactifs) (Marquis & Fritz, 1964 ; Cederblad & Lindstedt, 1972). Par ces méthodes, il est possible de déterminer le pool de carnitine libre. En revanche, seule la spectrométrie de masse associée aux techniques séparatives permet de déterminer le profil en acyl-carnitines et de diagnostiquer certaines perturbations métaboliques. A partir de 1993, des méthodes décrivent le couplage de la spectrométrie de masse avec la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS/MS ; van Bocxlaer & Leenheer, 1993 ; Costa *et al.*, 1997), l'électrophorèse capillaire (CE-MS/MS ; Heinig & Henion, 1999 ; Chalcraft & Britz-McKibbin, 2009), la chromatographie liquide à haute performance (LC-MS/MS ; Minkler & Hoppel, 1993 ; Vernez *et al.*, 2003; Maeda *et al.*, 2007) et dernièrement, la chromatographie liquide ultra haute performance, qui permet d'améliorer la séparation des acyl-carnitines et de raccourcir les temps d'analyse (UPLC-MS/MS ; Zuniga & Li, 2011 ; Miller *et al.*, 2012).

3.5. Activité transférase dans le métabolisme de la carnitine

La plupart des fonctions biologiques attribuées à la carnitine impliquent son estérification réversible à des AG. Cette réaction est catalysée par une famille d'enzymes nommées carnitine acyl-transférases, qui est composée de 4 membres classés en fonction de leurs substrats préférentiels : la carnitine acétyl-transférase (CAT ; EC 2.3.1.7) pour les acyl-CoA à courtes chaînes (C2:0 à C4:0), la carnitine octanoyl-transférase (COT ; EC 2.3.1.137) pour les acyl-CoA à chaîne moyenne (C6:0 à C10:0), la carnitine palmitoyl-transférase 1 et 2

(CPT1 ou CPTe ; CPT2 ou CPTi ; EC 2.3.1.21) pour les acyl-CoA à moyenne et longue chaîne (C12:0 à C18:0).

Chez les animaux, la CAT est une protéine soluble présente dans le peroxysome, la mitochondrie et le RE et est largement distribuée dans tous les tissus (Ramsay & Zammit, 2004 ; Zammit *et al.*, 2009 ; Tableau 2).

Règne	Localisation cellulaire	Carnitine acyl-transférases
Animaux	peroxysome	CAT ; COT
	mitochondrie	CAT; CPT1 (e) ; CPT2 (i)
	réticulum endoplasmique	CAT ; CPT
Levures	peroxysome	CAT
	mitochondrie	CAT

Tableau 2 Localisation cellulaire des différentes acyl-carnitines transférases mises en évidence chez les animaux et les levures. Abréviations: **CAT**, carnitine acétyl-transférase ; **COT**, carnitine octanoyl-transférase ; **CPT1 (e)**, carnitine palmitoyl-transférase de la membrane externe de la mitochondrie ; **CPT2 (i)**, carnitine palmitoyl-transférase de la membrane interne de la mitochondrie

La COT quant à elle est exclusivement présente dans le peroxysome. La CPT1 est localisée dans la membrane externe de la mitochondrie avec le site actif dirigé vers le cytosol permettant l'importation des acyl-CoA à longues chaînes dans la mitochondrie. Son activité est considérée comme une étape limitante de la β -oxydation des acyl-CoA et le malonyl-CoA régule fortement son activité (McGarry *et al.*, 1978). Il existe 3 isoformes découvertes à ce jour : la CPT1A est ubiquitaire, mais est fortement exprimée dans le foie et les reins, la CPT1B est présente principalement dans les muscles cardiaques et squelettiques et la CPT1C est exprimée dans le cerveau (Zammit *et al.*, 2009 ; Price *et al.*, 2002). La CPT2 quant à elle, n'a qu'une seule isoforme, n'est pas sensible au malonyl-CoA et est exprimée dans tous les tissus. Elle est ancrée dans la membrane interne de la mitochondrie avec le site actif dirigé vers la matrice mitochondriale (Woeltje *et al.*, 1990). Cette enzyme catalyse la conversion des acyl-carnitines importées dans la mitochondrie en leurs acyl-CoA respectifs qui seront dégradés par les réactions de la β -oxydation. Une étude *in vitro* montrent que la CPT2 est également capable de catalyser la réaction inverse (Ventura *et al.*, 1998).

3.6. Rôles biologiques de la carnitine

3.6.1. Implication dans le transport intracellulaire des AG activés

Chez l'animal, la β -oxydation des AG a lieu principalement dans la matrice mitochondriale bien que certains AG soient préalablement pris en charge par le peroxysome (Wanders *et al.*, 2001 ; Antonenkov & Hiltunen, 2012). Chez les différents règnes, un nombre croissant d'études indiquent que des transporteurs de type ABC catalysent le transfert des AG à travers la membrane peroxysomale en vue d'alimenter la β -oxydation (Hettema & Tabak, 2000 ; Footitt *et al.*, 2002 ; van Roermund *et al.*, 2011 ; Kemp *et al.*, 2011). Les VLCFA, les AG branchés et les AG dicarboxyliques à longue chaîne, sont partiellement oxydés dans le peroxysome en MCFA et en acétyl-CoA (Antonenkov & Hiltunen, 2012) (Figure 11). Les produits de β -oxydation sont ensuite convertis en acétyl-carnitine par la CAT et acyl-carnitines par la COT et seraient pris en charge par une translocase (CAC) pour traverser la membrane peroxisomale et rejoindre le cytosol (Fraser & Zammit, 1999 ; Strijbis *et al.*, 2010 ; Violante *et al.*, 2013). Les MCFA et les LCFA sont importés dans la mitochondrie par un système de transport impliquant à nouveau la carnitine. Ce système est composé de la CPT1, d'une carnitine acyl-translocase (CACT) et de la CPT2 (Figure 11). Les acyl-CoA du cytosol sont convertis en acyl-carnitines par la CPT1 (Ramsay *et al.*, 2001). Les acyl-carnitines diffusent librement dans la membrane externe de la mitochondrie et passe à travers la membrane interne par l'intervention de la CACT en échange de carnitine libre. La CPT2 catalyse ensuite la réaction inverse, en substituant la carnitine par le coenzyme A. Les acyl-CoA générés sont ensuite oxydés dans la matrice mitochondriale en acétyl-CoA pour alimenter le cycle TCA.

Au niveau du RE chez l'animal, la mesure d'activités CPT suggère également l'intervention d'un système de transport dépendant de la carnitine. Cette dernière contribuerait à l'importation d'AG cytosolique vers le lumen du RE pour la synthèse de glycérolipides et en particulier des TAG (Washington *et al.*, 2003).

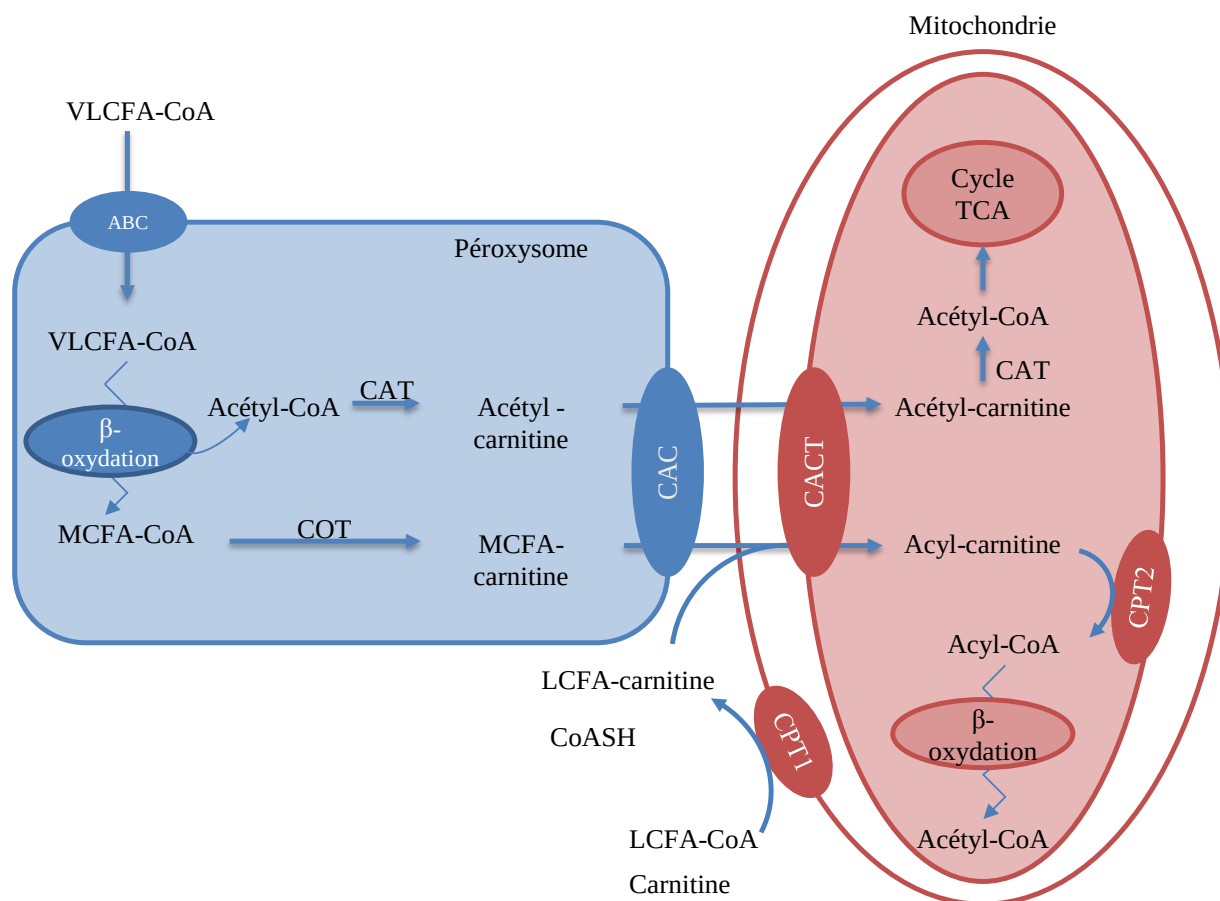


Figure 11 Schéma représentant les sites de β-oxydation péroxyssomale et mitochondriale chez les animaux (adapté de la Thèse de Bourdin, 2007). Abréviations : **ABC**, ATP-Binding Cassette ; **CAC** et **CACT**, carnitine acyl-carnitine translocase ; **CAT**, carnitine acétyl-transférase ; **CoA**, coenzyme A ; **CoASH**, coenzyme A réduit ; **COT**, carnitine octanoyl-transférase ; **CPT1**, carnitine palmitoyl-transférase 1 ; **CPT2**, carnitine palmitoyl-transférase 2 ; **LCFA**, long chain fatty acid ; **MCFA**, moyen chain fatty acid ; **TCA**, tricarboxylic acid cycle ; **VLCFA**, very long chain fatty acid.

3.6.2. Homéostasie du pool d'acétyl-CoA/CoA

La carnitine peut moduler l'homéostasie du ratio acétyl-CoA/CoA mitochondrial (Stephens *et al.*, 2007). Il a ainsi été démontré, qu'au cours d'une activité physique l'acétyl-CoA peut être généré plus rapidement par la pyruvate déshydrogénase mitochondriale (EC 1.2.4.1) qu'il n'est pris en charge par le cycle TCA. Pour éviter une accumulation de ce précurseur dans la mitochondrie, le groupement acétyl est transféré à la carnitine par la CAT ce qui permet de maintenir le coenzyme A disponible pour l'activation d'autres acides organiques (en vue d'une β-oxydation, cycle TCA,...). L'acétyl-carnitine est exporté vers le cytosol et constitue une réserve d'acétyl rapidement métabolisable par le cycle TCA suite à sa

réimportation. Après quelques minutes d'un effort physique intense, les teneurs en carnitine libre chutent de 75 à 20 % du pool total de carnitine du muscle squelettique au repos. Cette réduction est attribuée en grande partie à la formation d'acétyl-carnitine en corrélation avec l'accumulation d'acétyl-CoA musculaire (Constantin-Teodosiu *et al.*, 1992, cités par Stephens *et al.*, 2007).

3.6.3. Interaction avec les protéines et acylation

Des études rapportent également un rôle possible de la carnitine dans la signalisation cellulaire dont les mécanismes restent encore à déterminer. Les caspases 3, 7, 8 sont des enzymes impliquées dans le contrôle de la mort cellulaire de type apoptotique et une étude menée sur des cultures de cellules cancéreuses indique qu'un déséquilibre de la balance carnitine/palmitoyl-carnitine pourrait réguler l'activité de ces caspases (Mutomba *et al.*, 2000). Il est suggéré qu'une augmentation anormale de palmitoyl-carnitine réduirait la disponibilité de la carnitine intracellulaire et induirait une levée d'inhibition des caspases. Toujours avec ce type cellulaire, il a été montré que la palmitoyl-carnitine pourrait bloquer l'autophosphorylation de la Protéine Kinase C (PKC) et réguler par ce fait le processus de prolifération et de différenciation cellulaire (Sobiesiak-Mirska *et al.*, 2003). Par ailleurs, la carnitine pourrait être un régulateur de récepteurs protéiques impliqués notamment dans la réponse aux glucocorticoïdes ou aux hormones thyroïdiennes (Manoli *et al.*, 2004 ; Benvenga *et al.*, 2004).

Le pool d'acyl-carnitines, en équilibre avec le pool d'acyl-CoA, peut constituer une réserve d'acyles activées alimentant les cycles de déacylation/réacylation des phospholipides des membranes des cellules érythrocytaires (Arduini *et al.*, 1992). La carnitine peut aussi être impliquée dans la modification post-traductionnelle de protéines par palmitoylation. Ainsi, la présence de palmitoyl-carnitine augmente le taux de résidus palmitate associés à la protéine GAP-43 (au niveau des acides aminés Cystéine³ et Cystéine⁴) impliquée dans le développement neuronal, la neuroplasticité et la neurotransmission. La palmitoylation de GAP-43 empêche sa phosphorylation et induit ainsi une inhibition de la différenciation cellulaire (Nalecz *et al.*, 2007).

3.6.4. Détoxification

La présence d'acyl-carnitines atypiques dans les urines témoigne de l'implication de la carnitine dans l'excrétion de certains xenobiotiques potentiellement toxiques pour la cellule. Les AG complexes issus de composés thérapeutiques (antibiotiques, anticancéreux) tels que le valproate ou le pivalate, sont convertis dans la mitochondrie en leur acyl-CoA respectif et ne sont pas pris en charge par la β -oxydation. Les groupements acyles sont transférés à la carnitine et les esters de carnitine sont exportés de la mitochondrie, puis de la cellule, avant d'être évacués par les urines évitant ainsi une accumulation toxique de ces composés (Brass, 2002 ; Ohnishi *et al.*, 2008).

3.6.5. Propriété antioxydante

In vitro, la carnitine sous sa forme libre présente une activité antioxydante plus importante que l' α -tocophérol (composé antioxydant de référence), contre la peroxydation de l'acide linoléique (Gülçin, 2006). Par ailleurs, chez le rat l'administration de carnitine réduit les dommages oxydatifs liés à la prise de toxines mitochondriales et de précurseurs de radicaux libres (Silva-Adaya *et al.*, 2008).

Sous sa forme acétylée, la carnitine pourrait avoir un effet protecteur contre le stress oxydatif par l'induction de l'expression de gènes impliqués dans le pouvoir antioxydant de la cellule. Pour les astrocytes corticaux primaires de rat (cellules gliales du système nerveux central), l'administration d'acétyl-carnitine aurait un effet protecteur contre les altérations mitochondriales et la mort cellulaire induites par les cytokines, grâce une augmentation de l'expression de l'hème oxygénase-1 (HO-1) (Calabrese *et al.*, 2005). Cette augmentation du potentiel antioxydant liée à l'acétyl-carnitine induirait également la synthèse de protéines de choc thermique (HSP60, HSP72, SOD) et une forte expression du facteur de transcription redox-sensibles Nrf2 (Calabrese *et al.*, 2006).

D'autre part, une étude montre un effet bénéfique d'une supplémentation en propionyl-carnitine contre les dommages oxydatifs dans le foie et le cœur de rats hypertendus. Chez les rats traités au propionyl-carnitine, il a été notamment observé une augmentation du pouvoir réducteur disponible grâce au système glutathion permettant d'éliminer les radicaux libres, en concomitance avec une diminution des niveaux de peroxydation des lipides (Gomez-Amores *et al.*, 2006).

3.6.6. Propriété osmoprotectante

Chez les bactéries, le seul rôle attribué à la carnitine est son implication dans la tolérance au stress osmotique. La carnitine est un soluté compatible qui peut s'accumuler à des niveaux élevés dans la cellule sans altérer les fonctions cytoplasmiques et agit comme un osmolyte en aidant les cellules bactériennes à faire face à un stress froid (Angelidis & Smith, 2003a) ou à un stress osmotique (Angelidis & Smith, 2003b ; Canovas *et al.*, 2007). La carnitine est également susceptible d'être impliquée dans l'adaptation des cellules épидидymaires contre l'hypertonie de l'environnement (Peluso *et al.*, 2000 ; Cotton *et al.*, 2010). Dernièrement, Nebbioso *et al.* (2013) ont d'ailleurs montré que l'utilisation de gouttes pour les yeux supplémentées en carnitine pouvait être envisagée comme un traitement local contre l'hyperosmolarité du film lacrymal.

4. AVANCEE DES CONNAISSANCES SUR LA CARNITINE CHEZ LES PLANTES

4.1. Présence de la carnitine chez les plantes

La présence de carnitine chez les plantes est connue depuis les années 1950 et a été dosée par méthode biologique (Fraenkel, 1951 ; cité par Wolf, 2006). Ce composé a ensuite été quantifié plus directement par une méthode spectrophotométrique adaptée d'un protocole utilisé sur les tissus animaux (dosage au DTNB ou 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) (Marquis & Fritz, 1964 ; Panter & Mudd 1969). Par cette méthode, la carnitine a été mise en évidence et dosée dans différents tissus et organes de céréales, mais par manque de sensibilité, elle n'a pas été détectée dans tous les tissus analysés (McNeil & Thomas, 1976). Une méthode enzymatique radioactive au ^{14}C , mise au point sur les tissus animaux (par Cederblad & Lindstedt, 1972) a permis de quantifier la carnitine dans le pois (McNeil & Thomas, 1976) et dans l'orge (Ariffin *et al.*, 1982) (Tableau 3).

Actuellement, la méthode la plus fiable et la plus sensible pour doser la carnitine et les acyl-carnitines dans les tissus et les fluides animaux est une méthode basée sur la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS-MS) (Vernez *et al.*, 2003). Cette méthode a été adaptée par notre équipe aux tissus végétaux et a permis pour la première fois de mettre en évidence la présence d'acyl-carnitines au côté de la carnitine libre dans des tissus de plantes oléagineuses (*Arabidopsis*, colza et lin) et non

oléagineuses (tabac ; Bourdin *et al.*, 2007). Chez les plantes, la carnitine est donc associée à des acyles allant des courtes chaînes carbonées (C2:0) aux longues chaînes carbonées (C20:0). Les teneurs en carnitine libre et en acyl-carnitines sont respectivement 100 à 1000 fois inférieures par rapport à ce que l'on peut mesurer chez l'animal (van Vlies *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent que le métabolisme végétal utilise moins les acyl-carnitines que le métabolisme animal, peut-être du fait de sa photo-autotrophie (Bourdin *et al.*, 2007). La présence d'acyl-carnitines, en complément d'activités carnitine transférases mesurées dans des tissus végétaux, prouvent que la carnitine est également associée au métabolisme lipidique chez les plantes.

Matériel végétal	Teneur en carnitine (ng/mg de MS)
Riz ^c	71
Avoine (graine) ^a	1
Avoine (plantule) ^a	14
Blé (graine) ^a	4
Blé (plantule) ^a	4
Chou fleur ^a	14
Pois ^{b,c}	11
Avocat ^a	48
Arabidopsis ^d	1,1 ±0,2
Lin ^d	5,1 ±3,1
Colza ^d	3,2 ±2,1
Tabac ^d	2,7 ±1,7

Tableau 3 Teneur en carnitine libre mesurée dans certaines plantes (**a** : Panter & Mudd, 1969 avocat =mesocarpe ; **b** : McNeil & Thomas, 1976 ; **c** : Rudman *et al.*, 1977 ; **d** : Bourdin *et al.*, 2007 (plantules) ; **MS** : matière sèche).

4.2. Activités carnitine acyl-transférases

Des activités carnitine acyl-transférases ont été mesurées dans différents compartiments de la cellule végétale (Tableau 4). Panter et Mudd (1973) mettent en évidence pour la première fois l'oxydation de la palmitoyl-carnitine par des mitochondries isolées du mésocarpe d'avocat. Ils suggèrent la présence d'une CPT nécessaire à la conversion de la palmitoyl-carnitine en palmitoyl-CoA et d'un système de transport proche de l'animal pour l'importation d'AG dans la mitochondrie destinée à la β -oxydation.

Localisation cellulaire	Activités acyl-carnitine transférases
Mitochondries	CAT ^a , CPT1 ^b , CPT2 ^b
Plastes	CAT ^c , CPT ^c

Tableau 4 Localisation cellulaire des activités acyl-carnitines transférases mesurées chez les plantes dans différentes études (**a** : Burgess & Thomas, 1986 ; **b** : Thomas & Wood, 1986 ; **c** : Masterson & Wood, 2000b et 2009). Abréviations : **CAT**, carnitine acétyl-transférase ; **CPT1 (e)**, carnitine palmitoyl-transférase de la membrane externe de la mitochondrie ; **CPT2 (i)**, carnitine palmitoyl-transférase de la membrane interne de la mitochondrie.

Par la suite, des activités carnitine acétyl-transférases ont été mesurées dans la matrice mitochondriale de cotylédons de pois et également des activités CPT sur la membrane externe et interne (CPT1 et CPT2) (Burgess & Thomas, 1986 ; Thomas & Wood, 1986). Dans le cas des mitochondries isolées d'hypocotyles de haricots, une carnitine acyl-transférase à large spécificité de substrats a été purifiée et caractérisée (Schwabedisse-Gerbling & Gerhardt, 1995). Les propriétés biochimiques (petite taille, structure monomérique, insensibilité au malonyl-CoA) de cette enzyme, laissent penser à une CAT qui peut prendre en charge aussi bien les acyl-CoA à courtes chaînes (dont l'acétyl-CoA) que les acyl-CoA à longues chaînes (C16:0 ; C18:0 ; C18:1 ; C18:2 ; C18:3). Des activités CAT et CPT ont aussi été mesurées dans des étio-chloroplastes de feuilles d'orge (Thomas *et al.*, 1983) et des chloroplastes de pois (McLaren *et al.*, 1985 ; Masterson & Wood, 2000b) mais aucune activité carnitine acyl-transférase n'a encore été détectée dans le peroxyosome (Miernyk & Trelease, 1981 ; Gerbling & Gerhardt, 1988). Malgré la mesure d'activités carnitine transférase, aucune enzyme n'a encore été séquencée chez la plante. A ce titre, des mutants perte-de-fonction pour la CAT ou la CPT pourraient être des outils intéressants pour la compréhension des rôles biologiques de la carnitine chez les végétaux.

4.3. Biosynthèse de la carnitine chez les plantes

La plante peut prélever du sol un large éventail de molécules azotés et notamment des composés avec une fonction ammonium quaternaire, tels que les bêtaïnes dont la carnitine (Warren *et al.*, 2013). Mais comme chez l'animal, une partie du pool de carnitine libre est issue d'une synthèse endogène, dont les mécanismes réactionnels restent encore inconnus

chez les plantes. Chez l'animal, le précurseur TML subit 4 étapes de transformation avant d'être converti en carnitine. Notre équipe a identifié la présence de TML et de γ -BB dans des plantules d'*Arabidopsis* et une expérience complémentaire avec une supplémentation en TML deutérée, a permis la détection de carnitine deutérée (Rippa *et al.*, 2012). Ces données suggèrent que la TML et probablement la γ -BB, sont des précurseurs pour la synthèse de la carnitine chez la plante à l'instar de l'animal et de la levure. En réalisant une analyse par BlastP, contre les séquences protéiques d'enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse de la carnitine chez l'animal ou les levures, des séquences protéiques homologues pour les étapes 2 et 3 ont été suggérées chez *Arabidopsis* (Rippa *et al.*, 2012). Concernant l'étape 2, la HTML aldolase (HTMLA) d'origine humaine, serait identique à la sérine hydroxyméthyl-transférase (SHMT ; EC 2.1.2.1) cytosolique d'*Arabidopsis*. Le génome d'*Arabidopsis* contient 7 gènes codant des SHMTs, dont SHMT1 qui présente une identité de 58% et une similarité de 74% avec son homologue humain. La TMABADH (EC 1.2.1.47) qui est impliquée dans la 3^{ème} étape de la voie de biosynthèse de la carnitine chez l'humain, est une aldéhyde déshydrogénase (ALDH ; EC 1.2.1.3). Chez *Arabidopsis*, les groupes 2 et 10 de la grande famille multigénique des ALDH présentent une forte homologie de séquence avec la TMABADH humaine (respectivement 37 et 39 %). Dernièrement, une étude réalisée sur le pois indique que des aminoaldehyde dehydrogenases (PsAMADH 1 et 2) appartenant à la famille des ALDH, peuvent catalyser l'oxydation du TMABA en γ -BB (Tylichova *et al.*, 2010). Or chez *Arabidopsis* les protéines du groupe 10 de la famille des ALDH sont fortement homologues avec ces enzymes étudiées chez le pois (plus de 70 % d'identité). De plus, il a été démontré que ALDH10A9 notamment oxyde également le 4-aminobutyraldéhyde (ABAL) et le 3-aminopropionaldéhyde (APAL) *in vitro* (Missihoun *et al.*, 2011). Ces données suggèrent que les protéines ALDH 9 et 10 pourraient être impliquées dans la conversion du TMABA en γ -BB. En revanche, pour les étapes 1 et 4 aucun résultat significatif n'a été trouvé, ce qui laisse à penser que ces réactions pourraient être catalysées par des enzymes non homologues aux enzymes animales et de levures, mais présenteraient une homologie d'action. Cette étude bioinformatique a été à l'origine d'un travail de thèse mené en parallèle au sein de notre équipe (Ying Juan ZHAO, 2014). Ce travail a permis l'identification de mutants d'*Arabidopsis* affectés dans la synthèse de carnitine, outils essentiels pour compléter et améliorer nos connaissances sur les rôles biologiques de la carnitine dans le règne végétal.

4.4. Transport de la carnitine chez les plantes

Chez les animaux, les transporteurs organiques (OCTN1-3) avec une affinité plus ou moins grande pour la carnitine, sont impliqués dans l'homéostasie et la distribution de ce composé vers les différents tissus. En 2007, Lelandais-Brière *et al.* caractérisent AtOCT1, une protéine d'*Arabidopsis* qui partagerait la plupart des caractéristiques structurales et biochimiques des OCTN de l'animal. Les expériences de marquage d'AtOCT1 avec la GFP révèlent que la protéine est localisée au niveau de la membrane plasmique dans des cellules épidermiques d'oignon et des protoplastes d'*Arabidopsis*. L'étude du transport de la carnitine par complémentation du double mutant de levure $\Delta cit2/\Delta agp2p$ affecté dans le transport de la carnitine, montre qu'AtOCT1 permet de véhiculer la carnitine à travers la membrane plasmique. En condition normale de culture *in vitro*, le mutant *oct1-1* présente un système racinaire latéral plus développé que son type sauvage (Wassilewskija, WS). En revanche, l'apport de carnitine exogène dans le milieu de culture induit un raccourcissement de la racine primaire et une augmentation du nombre de racines latérales chez WS, alors que *oct1-1* n'est pas affecté et serait insensible à la carnitine. De plus, une fusion du gène GUS avec le promoteur d'AtOCT1 révèle que la protéine est principalement exprimée au niveau des tissus vasculaires dans les parties reproductrices, le collet et les racines (primaires et secondaires). AtOCT1 est fortement induit pendant la germination, puis son expression diminue au cours du développement, avant d'être surexprimé plus tard dans les parties reproductrices. Par ailleurs, une étude récente de transcriptomique a montré que le gène AtOCT1 est surexprimé en condition de carence en phosphate chez *Arabidopsis* (Woo *et al.*, 2012). A l'heure actuelle, le mutant *oct1-1* qui est affecté dans le transport de la carnitine est le seul outil de génétique inverse disponible pour étudier les rôles biologiques de la carnitine.

4.5. Rôles possibles de la carnitine chez les plantes

4.5.1. Implication de la carnitine dans une β -oxydation mitochondriale

Des études montrent que l'oxydation du palmitate dans les mitochondries de cotylédon de pois, n'est possible qu'en présence de CoASH, Mg^{2+} , ATP, malate et carnitine (Wood *et al.*, 1984). Si les membranes des mitochondries sont perturbées par des traitements agressifs (Triton X100, sonication, choc osmotique) l'ajout de carnitine dans le milieu réactionnel n'a plus d'effet stimulant sur l'oxydation du palmitate. Par ailleurs, des activités carnitine acyl-transférases de type CAT, CPT1, CPT2 ont été mesurées dans des mitochondries de différents

tissus végétaux (Burgess & Thomas, 1986 ; Thomas & Wood, 1986 ; Schwabedissen-Gerbling & Gerhardt, 1995). De plus, il a été montré que l'étomoxir a un effet inhibiteur sur la β -oxydation mitochondriale au niveau des cotylédons de plantules de pois, sans affecter la β -oxydation peroxysomale (Masterson & Wood, 2009). Or, l'étomoxiryl-CoA est un inhibiteur irréversible de la carnitine palmitoyl-transférase de la membrane externe (CPT1) des mitochondries chez l'animal (Agius *et al.*, 1991). Ces données réunies plaident en faveur de l'existence d'un transport carnitine dépendant, permettant l'importation d'AG activé dans la mitochondrie et l'exportation d'acétyl-CoA issu de la β -oxydation pour des processus biosynthétiques (Masterson & Wood, 2000a et 2009).

4.5.2. Synthèse et trafic lipidique

La synthèse des membranes du chloroplaste requière l'exportation d'AG, principalement l'oléate et le palmitate, vers le RE pour subir des modifications éventuelles une fois intégrés dans la PC (Benning, 2009). Cette dernière peut être convertie en DAG et réimportée dans le chloroplaste pour contribuer à la synthèse des glyco-glycérolipides et des phosphoglycérolipides nécessaires à la biogenèse des membranes chloroplastiques. Les mécanismes d'exportation des AG vers la voie eucaryotique et de réimportation de lipides vers le chloroplaste restent encore mal connus.

Masterson & Wood (2000b) ont émis l'hypothèse d'un mécanisme de transport au niveau du chloroplaste dépendant de la carnitine. L'étude de chloroplastes de pois et d'étioplastes d'orge a permis de mettre en évidence des activités carnitine transférases (Thomas *et al.*, 1983 ; McLaren *et al.*, 1985 ; Masterson & Wood, 2000b). Une fois activés par une LACS, les AG destinés à l'exportation pourraient être pris en charge par un système impliquant des CPT et une translocase pour alimenter la voie eucaryotique. Par le mécanisme d'acyl-éditing, les AG insaturés formés sur la PC et libérés dans le pool d'acyl-CoA cytosolique pourraient être réintroduits dans le chloroplaste via le système de transport carnitine dépendant. Chez le pois, les CPT identifiées auraient une forte affinité pour les esters de carnitine à longues chaînes insaturées tels que la linoléoyl- et la linolényl-carnitine, mais aussi pour des acyl-carnitines saturés dont la palmitoyl-carnitine (Masterson & Wood, 2000b). D'après le postulat des auteurs, une des fonctions principales de ces CPT serait alors la réimportation d'AG insaturés vers le chloroplaste.

Par ailleurs, il a été montré qu'une supplémentation du milieu de culture en carnitine induirait une augmentation des teneurs en chlorophylles dans des feuilles d'orge et des plantules étiolées de pois exposées à la lumière (Thomas *et al.*, 1981 ; Masterson & Wood, 2009). La carnitine ne serait pas impliquée directement dans la voie de biosynthèse des chlorophylles, mais contribuerait plutôt à fournir les substrats nécessaires pour contribuer à la biogénèse des membranes de l'enveloppe chloroplastique et des thylakoïdes.

4.5.3. Protection cellulaire

Une étude récente menée par notre équipe montre qu'une supplémentation en carnitine améliore le taux de germination et de survie des plantules d'*Arabidopsis* cultivées sur un milieu enrichi en sel (Charrier *et al.*, 2012). L'effet osmoprotecteur de la carnitine, comparable à celui de la proline, est à rapprocher du rôle d'osmolyte décrit chez la bactérie (Canovas *et al.*, 2007) et l'animal (Peluso *et al.*, 2000 ; Cotton *et al.*, 2010). Les deux composés améliorent également la survie des semis lors d'un stress oxydatif (milieu enrichi en H₂O₂) (Charrier *et al.*, 2012). La carnitine interviendrait dans la résistance au stress oxydatif à travers ses propriétés antioxydantes comme il a été rapporté chez l'animal. Dans des conditions défavorables de culture induisant un stress osmotique ou oxydant, la carnitine et la proline n'agissent pas sur le taux de croissance des plantules, mais favoriseraient la germination et le développement post-germinatif en améliorant les conditions physiologiques de culture à travers leurs propriétés intrinsèques d'osmolyte et/ou d'antioxydant.

4.5.4. Régulation hormonale

Une analyse par puces à ADN, réalisée sur des plantules d'*Arabidopsis* traitées avec de la carnitine exogène (5 mM) révèle une faible modulation du transcriptome (Charrier *et al.*, 2012). Parmi les 34 gènes significativement régulés, des gènes impliqués dans le stress hydrique et dans la réponse à l'acide abscissique (ABA) sont fortement modulés. En condition de stress salin, l'étude de mutants affectés dans la biosynthèse (*aba1-1*) ou dans la réponse à l'acide abscissique (*abi1-1*), indiquent que la carnitine et la proline pourraient améliorer la résistance au stress salin par l'intermédiaire d'une régulation antagoniste de la voie de l'ABA.

MATERIEL & METHODES

1. MATERIEL VEGETAL

L'ensemble des expériences présentées dans cette étude a été réalisée avec l'écotype *Wassilewskija* (WS) d'*Arabidopsis thaliana*. Les mutants d'*Arabidopsis* utilisés au cours de ce travail ont été aimablement fournis par le Docteur Lelandais-Brière pour *oct1-1* (Institut Sciences du Végétal ; UPR 2355, France) et le Professeur Bonaventure pour *fatb-ko* (Plant Sciences – Cropdesign ; Gent Area, Belgique). Dans toutes les expérimentations, les graines du témoin sauvage sont issues de plantes cultivées en serre dans les mêmes conditions et de manière concomitante aux graines de plantes mutantes auxquelles elles sont comparées. Les études relatives au colza (*Brassica napus*) ont porté sur le cultivar Westar.

1.1. Culture *in vitro* des plantes

1.1.1. Culture des plantes en condition normale

La stérilisation des graines s'effectue sous hotte à flux laminaire horizontal. Les graines sont traitées pendant 3 min avec 1 mL d'éthanol aqueux à 70 % contenant 0,05 % (m/v) de sodium dodecyl sulfate (SDS). Elles sont ensuite rincées avec 1 mL d'éthanol 95 % pendant 1 min et mises à sécher sous hotte sur du papier Whatman (3 MM) préalablement autoclavé. Les graines sont réparties en boîtes de pétri sur le milieu M&S (Murashige & Skoog, Réf M5524, Sigma-Aldrich) en conditions stériles, puis stratifiées à 4°C pendant 4 jours. Les boîtes sont placées en armoire phytotronique avec une photopériode de 16 h, un éclairage de 150 μmol de photons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, une température de 24°C et une hygrométrie de 70 %.

1.1.2. Expériences d'étiollement et de dé-étiollement

Une fois stratifiée, les semis sont placés dans l'armoire phytotronique selon les conditions de culture présentées dans le §1.1.1. pendant 5 h, puis sont enveloppés de 3 couches de feuilles d'aluminium. Les plantules suivent un développement à l'obscurité (étiollement) pendant 48 h, avant d'être exposées à la lumière (dé-étiollement).

Le suivi du verdissement au cours du dé-étiollement est réalisé en mesurant l'évolution de la teneur en chlorophylles selon la méthode de Mackinney (1941). Dans un tube résistant à l'acétone, 150 mg de plantules sont broyés manuellement, puis 350 μL d'eau et 2 000 μL

d'acétone pure sont ajoutés. L'extrait est agité énergiquement pendant 1 min, avant d'être centrifugé à 3 000 g pendant 10 minutes. La teneur en chlorophylles est dosée à partir de la phase supérieure en mesurant l'absorbance à 645 nm (Chla) et à 663 nm (Chlb) et en appliquant la formule ci-dessous :

$$\text{Chl (a + b) (mg/ml)} = 0,0202 \times A_{645} + 0,0080 \times A_{663}$$

1.1.3. Exposition au froid des plantules d'*Arabidopsis*

Les boîtes sont placées en armoire phytotronique avec une photopériode de 16 h, un éclairage de 50 $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ pour se caler à l'intensité lumineuse de l'enceinte de traitement au froid, une température de 24°C et une hygrométrie de 70 %, pendant 14 jours. Elles sont ensuite transférées dans une autre enceinte avec des conditions de culture similaires à l'exception de la température qui est réglée à 7°C.

1.1.4. Culture sur des milieux M&S modifiés

Le milieu appauvri en phosphate et le milieu abolissant l'utilisation TAG sont adaptés du milieu M&S. La composition de ces différents milieux est détaillée en Annexe 1. Concernant l'expérience de carence en phosphate (selon López-Bucio *et al.*, 2002), les graines stratifiées sont cultivées au préalable sur un milieu M&S. Après 3 j de développement, les plantules sont transférées dans des boîtes de pétri de forme carrée (120 x 120 mm, VWR) avec un milieu contenant respectivement 1 μM (milieu appauvri en Pi ou -Pi) ou 1000 μM de phosphate (milieu normal ou +Pi) et sont disposées verticalement pour induire une croissance gravitropique des racines. La caractérisation phénotypique des racines est réalisée à l'aide du logiciel Image J 1.47.

1.1.5. Organogénèse

Les expérimentations de callogenèse et de rhizogénèse sur cal sont inspirées des travaux de Qiao *et al.* (2012) et Nameth *et al.* (2013). Les cellules indifférenciées (cals) sont initiées à partir de fragments de racines de plantules d'*Arabidopsis* (écotypes WS et *oct1-1*) développées pendant 15 jours sur milieu M&S. Les fragments de racines (0,5 cm) sont placés sur un milieu d'induction des cals (CIM pour callus induction medium) préparé avec du milieu de Gamborg (Réf G 5893, Sigma-Aldrich) supplémenté à 0,5 mg/L (2,3 μM) d'acide

2,4-dichlorophenoxy acétique (2,4-D) et à 0,1 mg/L (0,46 μM) de kinétine. Les cals formés sont ensuite transférés sur un milieu d'induction racinaire (RIM pour root induction medium) constitué du milieu de Gamborg supplémenté de 0,1 mg/L (0,54 μM) d'acide naphthalène acétique (NAA).

1.2. Culture des plantes en serre

Des graines d'*Arabidopsis* ou de colza sont semées sur du terreau (Universal Mix Lignum, TERRA BRILL Profiline) dans des pots (formats : 100 x 100 ou 200 x 200 mm), puis stratifiées à 4°C pendant 4 jours. Les plantes sont ensuite cultivées en serre avec une photopériode de 16 h, sous une lumière de 400 $\mu\text{mol de photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, une température de 24°C et un taux d'hygrométrie de 60 %. Les graines sont récoltées à maturité complète lorsque les siliques sont déhiscentes.

Concernant l'étude portant sur l'embryogénèse du colza, les fleurs de colza sont étiquetées et numérotées par ordre d'apparition. Le colza est une plante autogame et nous considérons que le premier jour de la floraison (correspondant au jour d'ouverture de la fleur) est concomitant avec la fécondation des ovules, amenant à la formation des embryons. Ainsi, le stade 14 jours après floraison correspond à un embryon âgé de 14 jours après floraison. Les embryons, sont prélevés à différents stades de développement et notamment au cours du remplissage, et conservé à -80°C avant analyse.

1.3. Détermination de la matière sèche

Pour chaque type de matériel végétal, un échantillon préalablement surgelé, est pesé avant et après passage dans le lyophilisateur (PowerDry LL1500, Thermo) pour en déterminer le poids de matière sèche (MS). Les teneurs en composés seront ainsi calibrées et exprimées par rapport à la matière sèche du matériel végétal.

2. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES ET ANALYTIQUES

2.1. Extraction et quantification des carnitines

2.1.1. Extraction de la carnitine libre et des acyl-carnitines

La carnitine libre et les acyl-carnitines contenues dans les tissus végétaux sont extraites à partir du même échantillon d'après la méthode mise au point dans le laboratoire et optimisée par rapport à Bourdin *et al.* (2007). Les échantillons végétaux (entre 50 et 100 mg de matière fraîche), préalablement conservés à -80°C , sont broyés dans l'azote liquide et repris dans 500 μL d'un mélange méthanol/eau (8/2 : v/v). Au moment de l'extraction, des standards internes sont ajoutés, à 5 ng de carnitine deutérée (carnitine- d_3) par mg de matière sèche de l'échantillon (L-Carnitine-methyl- d_3 hydrochloride, Sigma-Aldrich) et à 5 pg/mg de MS de ^{13}C -palmitoyl-carnitine (Palmitoyl-1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$ -L-carnitine hydrochloride, Sigma-Aldrich). Ces standards servent de références pour le calcul des teneurs en carnitine et acyl-carnitines endogènes. L'extrait est ensuite traité aux ultrasons à 90 Watts pendant 20 secondes puis centrifugé à 15 700 g pendant 10 min à 4°C . Le surnageant est prélevé et centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Le surnageant récolté est séché sous flux d'azote à 50°C et conservé à -20°C .

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

2.1.2. Extraction de la carnitine estérifiée

Pour chaque matériel végétal analysé, une extraction est réalisée sur un second lot du même échantillon, incluant une étape d'hydrolyse (saponification) afin de libérer et quantifier la fraction de carnitine estérifiée qui n'est pas prise en compte dans le dosage des acyl-carnitines. En effet, nos analyses en spectrométrie de masse ne concernent pas toutes les acyl-carnitines, correspondant à l'ensemble des AG et de plus, la carnitine peut-être liée à d'autres types d'acides organiques. Pour cela, la procédure d'extraction mise en place est comparable à celle décrite au §2.1.1. mais (1) le mélange méthanol/eau est remplacé par un mélange aqueux

de méthanol/KOH (8/2 : v/v) dont la concentration finale en KOH est de 0,1 M, (2) l'échantillon est chauffé à 65°C pendant 30 min avant la première centrifugation et (3) au moment de l'analyse, l'échantillon est repris dans un mélange méthanol/eau (8/2 : v/v) auquel sont ajoutés 4,2 µL d'HCl 12 M pour neutraliser le KOH.

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

2.1.3. Analyse et quantification des carnitines par spectrométrie de masse triple quadripôle (QQQ-MS/MS)

2.1.3.1. Analyse des carnitines

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

La séparation chromatographique est effectuée à l'aide d'une chaîne HPLC Agilent 1290, munie d'une pompe binaire et d'un injecteur automatique refroidi par effet Peltier. Une colonne à interactions hydrophiles de type HILIC (Kinetex 2,6 µm Hilic 100A, 150 mm x 3,0 mm, Phenomenex) est utilisée. Vingt µL de l'échantillon à analyser sont injectés vers la colonne (maintenue à 30°C) avec un débit constant de 0,7 mL.min⁻¹ et une pression maximale de 1000 bars. Un gradient d'élution avec deux phases mobiles est utilisé : le solvant A est de l'eau additionnée d'acétate d'ammonium à 10 mM, et le solvant B se compose de 100 % d'acétonitrile. Le gradient démarre à 98 % de solvant B pendant 1,67 min, suivi d'une diminution progressive à 40 % en 23,33 min. Le solvant B est maintenu à 40 % pendant 12 min pour laver la colonne. Enfin, un post-time de 15 min à 98 % de solvant B est intégré à la méthode pour rééquilibrer la colonne. La sortie de colonne est couplée à un détecteur de type spectromètre de masse triple quadripolaire (Agilent 6460), équipé d'une source d'ionisation électrospray ESI associée au module complémentaire Jetstream. Les paramètres de la source ont été optimisés et définis comme présentés dans le Tableau 5.

Paramètre de la source	Condition
Sheath Gas Temp (°C)	400
Sheath Gas Flow (L.min ⁻¹)	12
Nebulizer Pressure (psi)	55
Nozzle Voltage (V)	250
Capillary Voltage (V)	2500
Drying Gaz Temp (°C)	300
Drying Gaz Flow (L.min ⁻¹)	12

Tableau 5 Paramètres optimisés de la source d'ionisation électrospray.

L'analyse est effectuée par détection de transitions multiples (MRM: Multiple Reaction Monitoring), en mode positif et permet ainsi d'analyser plusieurs transitions simultanément (ion parent > ion fils). Les ions parents et ions fils sont indiqués en masse/charge (m/z) (**Tableau 6**).

Composé	Formule	Masse (g/mol)	Ion parent (m/z)	Ion fils (m/z)	Tension de Fragmenteur (V)	Dwell time (ms)	Energie de Collision (eV)
Camitine	C ₇ H ₁₅ NO ₃	161,1	162,1	103,1	120	100	16
				60,1	120	100	12
Camitine-d ₃	D ₃ C ₇ H ₁₂ NO ₃	164,1	165,1	103,1	120	100	16
				60,1	120	100	12
Acétyl-camitine	C ₉ H ₁₇ NO ₄	203,1	204,1	85,0	95	100	16
				60,1	95	100	12
Lauroyl-camitine	C ₁₉ H ₃₇ NO ₄	343,3	344,3	85,0	160	80	24
				60,1	160	80	20
Myristoyl-camitine	C ₂₁ H ₄₁ NO ₄	371,3	372,3	85,0	160	80	24
				60,1	160	80	20
¹³ C-palmitoyl-camitine	C ₂₃ H ₄₅ NO ₄ D ₂	403,4	404,4	85,0	170	80	28
				60,1	170	80	24
Palmitoyl-camitine	C ₂₃ H ₄₅ NO ₄	399,3	400,3	85,0	165	80	28
				60,1	165	80	24
Stéaroyl-camitine	C ₂₅ H ₄₉ NO ₄	427,4	428,4	85,0	165	80	24
				60,1	165	80	24
Oléoyl-camitine	C ₂₅ H ₄₇ NO ₄	425,4	426,4	85,0	185	80	28
				60,1	185	80	24
Linoléoyl-camitine	C ₂₅ H ₄₅ NO ₄	423,3	424,3	85,0	155	80	28
				60,1	155	80	24
Arachidoyl-camitine	C ₂₇ H ₅₃ NO ₄	455,4	456,4	85,0	190	80	28
				60,1	190	80	24

Tableau 6 Paramètres de fragmentation établis pour la formation des ions fils à partir des ions parents (les différents standards ont été obtenus de la société Sigma Aldrich).

Les composés analysés ont un temps de rétention stable et reproductible, autour de 10 min pour les acyl-carnitines et entre 14-16 min pour les

molécules polaires telles que l'acétyl-carnitine et la carnitine. Ainsi, des segments de temps ont été ajoutés à l'analyse pour cibler la recherche des analytes cibles, améliorer la sensibilité de détection et limiter une pollution inutile du spectromètre de masse (**Tableau 7**).

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

Tableau 7 Segments de temps appliqués durant l'analyse des carnitines.

2.1.3.2. Quantification des carnitines

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

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

Q_A : teneur du composé à déterminer

A_A : aire de pic du composé

A_{EI} : aire de pic de l'étalon interne

Q_{EI} : quantité connue d'étalon interne ajouté lors de l'extraction, 5 ng/mg MS pour la carnitine- d_3 et 5 pg/mg MS pour la ^{13}C -palmitoyl-carnitine.

La carnitine libre est quantifiée par rapport à la carnitine deutérée et les différentes acyl-carnitines par rapport au ^{13}C -palmitoyl-carnitine. Les teneurs sont toutes exprimées par rapport à la matière sèche (MS) de l'échantillon végétal.

2.1.4. Recherche des esters de carnitine par spectrométrie à temps de vol (qTOF-MS/MS)

2.1.4.1. Préparation des échantillons

Pour chaque analyse, 1 g du matériel végétal a été soumis à une extraction par du méthanol/eau (8/2 : v/v), avec ajout du standard interne ^{13}C -palmitoyl-carnitine à raison de 50 pg/mg MS (cf. 2.1.1.). Après séchage sous un flux d'azote, les extraits ont été repris dans 100 μL de méthanol/eau (8/2 : v/v), avant d'être analysé par LC-ESI-MS/MS (qTOF).

2.1.4.2. Analyse des esters de carnitine

La recherche des esters de carnitine est réalisée par un système analytique de couplage de la société Agilent Technologie (Modèle Agilent 6538 UHD Accurate-Mass qTOF LC/MS) et dont la méthode analytique a été mise au point au sein du laboratoire.

La séparation chromatographique est effectuée à l'aide d'une chaîne HPLC Agilent 1290, munie d'une pompe binaire et d'un injecteur automatique refroidi par effet Peltier. Une colonne en phase inverse de type C18 (Kinetex 2.6 μm C18 100A, 100 mm x 2.1 mm, Phenomenex) est utilisée pour la séparation de molécules apolaires. Vingt μL de l'échantillon à analyser sont injectés vers la colonne (maintenue à 45°C) avec un débit constant de 0,6 mL/min et une pression maximale de 600 bars. Un gradient d'élution avec deux voies est utilisé : le solvant A est de l'eau additionnée d'acide formique à 0,1 % (v/v), et le solvant B se compose de 100 % de méthanol. Le gradient démarre à 2 % de solvant B pendant 2 min, suivi d'une augmentation progressive à 90 % en 28 min, puis à 100 % en 2 min. Le solvant B est maintenu à 100 % pendant 8 min pour laver la colonne.

La sortie de colonne est couplée à un détecteur de type spectromètre qTOF (Agilent 6538A), équipé d'une source d'ionisation électrospray ESI. Une première spectrométrie en mode positive permet de sélectionner les composés présentant une aire de pic relative supérieure à 70 000, qui sont systématiquement soumis à une seconde spectrométrie avec une tension de fragmenteur de 140 V et une énergie de collision de 15 eV (MS/MS). Les ions parents dont la fragmentation produit un ion fils d'un rapport m/z de $85,029 \pm 10^{-3}$ et induit une perte de neutre correspondant à une masse de $59,073 \pm 10^{-3}$ sont sélectionnés pour être traités.

2.2. Analyse de l'expression de gènes d'intérêt

2.2.1. Extraction d'ARN totaux de plantes

Les extractions d'ARN totaux de plantes sont réalisées à partir de 100 mg de matériel végétal à l'aide du kit « RNeasy® plant Mini Kit » (QIAGEN) d'après les instructions du fabricant.

2.2.2. Electrophorèse sur gel d'agarose

Pour vérifier la qualité des acides nucléiques extraits (ADN ou ARN) et produits d'amplification par PCR, ces derniers sont déposés sur un gel contenant entre 0,8 à 2 % (m/v) d'agarose, en fonction de la taille des fragments. Le gel est préparé dans du tampon TAE 0,5X (20 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA pH 8) auquel est ajouté du bromure d'éthidium (BET) à la concentration finale de 0,15 µg/mL. Avant d'être chargés, les échantillons sont additionnés de tampon de charge « Gel Loading Dye blue 6X » (BioLabs). L'ensemble est mis à migrer sous une tension de 100 V, dans la solution de tampon de migration TAE 0,5X. La taille et la quantité d'acides nucléiques peuvent être estimées par comparaison avec un marqueur de taille (Smart Ladder, Eurogentec).

2.2.3. Traitement DNase et transcription inverse

Pour éliminer toutes traces d'ADN, 20 µL d'ARN extrait est traité avec le kit « TURBO DNA-free™ » (AMBION), avant de réaliser la transcription réverse de 1 µg d'ARN avec le kit « M-MuLV Reverse Transcriptase » (Thermo SCIENTIFIC). Les ADNc synthétisés sont ensuite dilués au 1/20^{ème} avant d'être analysés.

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

Les taux de transcrits sont évalués par PCR quantitative en temps réel, comme décrit par Gutierrez *et al.* (2012), avec un LightCycler 480 (Roche) sur des plaques de 384 puits. Le milieu réactionnel nécessaire à la quantification des transcrits contient 5 µL de master-mix LightCycler 480 SYBR Green I (Roche), 2 µL d'ADNc, les amorces sens (Forward ou F) et antisens (Reverse ou R) à 0,5 mM chacune, dans un volume final de 10 µL. Les différents couples d'amorce (F/R) ont été déterminés par le logiciel en ligne PRIMER3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Tableau 8).

Locus	Nom	Amorce	Séquence 5'→ 3'
At1g13440	<i>GAPC2</i>	F	CGCATGGAATCAGTGAAAAA
		R	TCGTGTCGTTGACCTTATCG
At4g33380	<i>At4g33380</i>	F	GTGTTGTAACGGCTTGAGCA
		R	TGTTTGCATCTTTGGTACGG
At4g34270	<i>TIP41</i>	F	GCTCATCGGTACGCTCTTTT
		R	TCCATCAGTCAGAGGCTTCC
At5g25760	<i>PEX4</i>	F	CTTGGACGCTTCAGTCTGTG
		R	TGAACCCTCTCACATCACCA
At5g46630	<i>CLATHRIN</i>	F	GTTTGGGAGAAGAGCGGTTA
		R	CTGATGTCACTGAACCTGAACTG
At5g46290	<i>KAS1</i>	F	TGCCTTCAAACCTGATTTTC
		R	GGAATGAAAGAACCGCAAAA
At1g12640	<i>LPAAT1</i>	F	GTGCAGAACGGAAAGAAAGC
		R	ATTTTCGGACTGATCGCTTG
At3g25110	<i>FATA1</i>	F	GGAAGTGTGGTTCAAGG
		R	ACTACCCACTTCGTAAGATC
At1g63050	<i>LPCAT2</i>	F	ATGATCGATGGTTCGAAAGC
		R	GCGACTAGTGTTTCGTGCAA
At3g57650	<i>LPAAT2</i>	F	CCTTGCGGTGGTTCTATCAT
		R	GGGTGGTGATTGTCTTTTGG
At1g73220	<i>OCT1</i>	F	GCTGTCTCACTTTTGCGTCA
		R	ACCAAACACGATGAACGACA
At4g25490	<i>CBF1</i>	F	GCATGTCTCAACTTCGCTGA
		R	ATCGTCTCCTCCATGTCCAG
At5g05580	<i>FAD8</i>	F	CATCATCTTTTCCCGCAGAT
		R	GAAGTGGCAGAGGTCCAGAG

Tableau 8 Amorces utilisées pour les analyses effectuées avec la PCR quantitative en temps réel (Amorce F (forward) ou amorce sens ; amorce R (reverse) ou amorce antisens).

La spécificité de chaque couple d'amorces est vérifiée par Megablast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et leur courbe de fusion est déterminée comme décrit par Louvet *et al.* (2006). Les valeurs de cycle thresholds (CT) ou cycle seuil, pour chaque échantillon sont acquises avec le logiciel LightCycler 480 (Roche). Le CT est le nombre de cycles à partir duquel le produit de PCR est détectable par fluorescence. Le moment d'apparition de ce signal seuil de fluorescence est dépendant de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon amplifié. Cette valeur est à la base des calculs pour

quantifier l'ADN de façon absolue ou relative. Les données de PCR quantitative en temps réel sont normalisées à l'aide des gènes de référence pour réaliser une quantification relative. Ces derniers sont préalablement validés par le logiciel GeNorm et présentent des niveaux d'expression les plus stables dans les conditions étudiées. Enfin, le calcul de l'expression relative des gènes cibles est effectué selon la formule suivante:

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

T: gène cible

R: gène de référence

E: efficacité du couple d'amorces (T ou R)

CT: crossing thresholds

3. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES

Les données présentées avec écarts types sont issues d'au moins 3 répétitions biologiques, mise à part pour les analyses par qPCR où au moins 2 répétitions biologiques ont été traitées. L'analyse statistique est réalisée avec le logiciel InStat3. Les différentes méthodes utilisées sont paramétriques et pour vérifier que les données appartiennent à un échantillon de la population et suit une distribution gaussienne, la méthode de Kolmogorov & Smirnov est employée. La comparaison de 2 groupes est effectuée par un test de Student (T test), au-delà de 2 groupes, une analyse de variance (ANOVA) est appliquée. Le seuil de significativité est défini par la valeur de P ou P value avec * = $P < 5\%$, ** = $P < 1\%$ et *** = $P < 0.1\%$.

RESULTATS & DISCUSSION

1. OPTIMISATIONS

1.1. Optimisation du dosage de la carnitine chez les plantes

En 2007, l'adaptation d'une méthode mise en place sur les tissus et fluides animaux (Vernez *et al.*, 2003) a permis à notre équipe de doser dans des tissus végétaux à la fois la carnitine sous sa forme libre et les acyl-carnitines (Bourdin *et al.*, 2007). Il s'agit d'une méthode analytique associant une étape de séparation par chromatographie liquide haute performance (HPLC) et une étape de détection de molécules d'intérêt par la spectrométrie de masse (MS). Ce couplage est à l'heure actuelle considéré comme le plus sensible et le plus précis pour quantifier la carnitine et les composés associés.

A mon arrivée en thèse, le laboratoire s'est équipé d'un nouveau spectromètre de masse de type triple quadripôle (Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS Systems) dont il a fallu optimiser les paramètres de fragmentation et d'ionisation pour la quantification des carnitines. D'autre part, nous avons cherché à mettre en place une méthode analytique permettant d'augmenter la fiabilité et la sensibilité de l'analyse des carnitines tout en améliorant la séparation et la quantification de la carnitine et l'acétyl-carnitine. Pour ce faire, nous avons utilisé un autre type de colonne de chromatographie avec des interactions hydrophiles (HILIC) inventée en 1990 (Alpert, 1990) et qui suscite un intérêt croissant pour l'analyse de molécules polaires, telle que la carnitine (Sowell *et al.*, 2011). La chaîne HPLC/HILIC a été couplée au quadripôle pour l'analyse MS/MS qui est réalisée en mode Multiple Reaction Monitoring (MRM) (Figure 12).

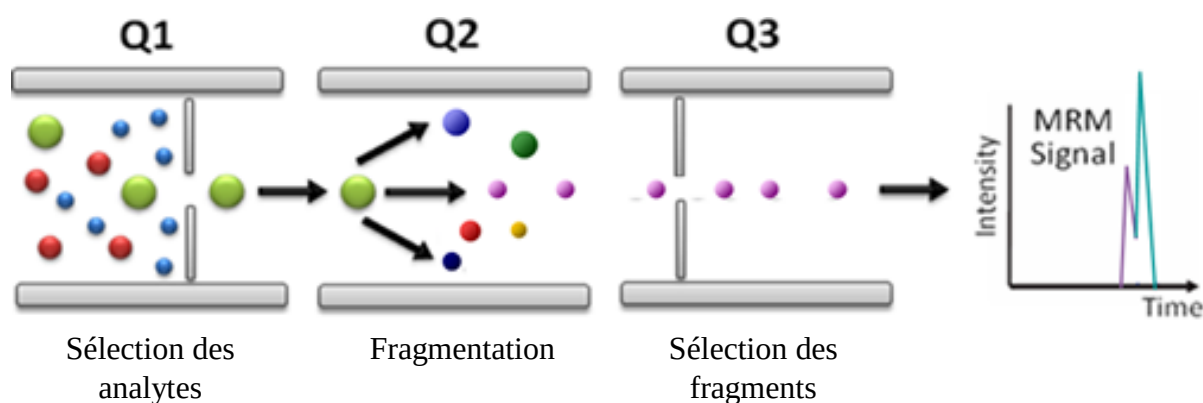


Figure 12 Schéma simplifié d'une analyse par spectrométrie de masse en mode Multiple Reaction Monitoring (MRM ; Q, quadripôle).

Ce mode d'analyse permet de sélectionner dans un premier temps l'ion parent (dans le premier analyseur ou Q1), qui est ensuite fragmenté en ions fils dans la cellule de collision (Q2). Le dernier quadripôle (Q3) est focalisé sur les ions fils générés qui sont entraînés vers le détecteur. Ce mode de la MS/MS est particulièrement adapté à la quantification des molécules d'intérêt présentes à de faibles concentrations dans les échantillons biologiques.

1.1.1. Paramètres de fragmentation

L'optimisation des paramètres de fragmentation est une première étape importante pour établir les transitions (ou génération d'ions fils) nécessaire à une quantification par MRM, et améliorer le rendement de fragmentation des ions parents. Dans un premier temps, en conservant les paramètres de sources par défaut (optimisation de la source présentée dans le paragraphe suivant), nous avons déterminé les paramètres optimaux de fragmentation, nécessaires à l'obtention des ions fils avec un signal le plus intense, grâce au logiciel optimizer (Agilent technology) (Tableau 9). Les standards à 1 ng/μL ont été préparés dans un mélange de méthanol/eau (8/2 : v/v) et ont été analysés par infusion directe dans le spectromètre de masse.

En règle générale plus la chaîne carbonée associée à la carnitine est longue, plus l'énergie de collision et la tension de fragmenteur nécessaire à la fragmentation des ions parent sont importantes. Ainsi, pour générer le fragment de m/z de 85, il faut appliquer respectivement pour l'acétyl-carnitine et l'arachidoyl-carnitine une tension de fragmenteur de 95 et 190 V et une énergie de collision de 16 et 28 eV. Ces caractéristiques de fragmentation corroborent les données trouvées dans la littérature (Miller *et al*, 2012), mise à part pour la carnitine où la tension de fragmenteur est plus élevée que pour l'acétyl-carnitine (120 contre 95 V respectivement). Pour chaque molécule, les 2 transitions (ion fils) les plus abondantes ont été retenues pour réaliser une quantification par le mode MRM. En effet, le calcul du rapport des intensités des 2 transitions déterminées pour chaque composé est une constante et constitue le meilleur moyen de confirmer la présence de ces composés dans les échantillons biologiques. Ainsi, les esters de carnitine présentent un profil de fragmentation spécifique avec la formation des ions fils m/z 85 et 60 correspondant respectivement à l'ion $[^+CH_2-CH=CHCOOH]$ et à l'ion $[N^+(CH_3)_3H]$ issu du réarrangement de McLafferty de la chaîne carbonée en C4:0, avec la perte du fragment triméthylammonium (Zuniga & Li, 2001). La

carnitine présente aussi le fragment m/z 85, mais nous avons retenu les ions de m/z 103 et 60 qui sont les plus abondants (Figure 13).

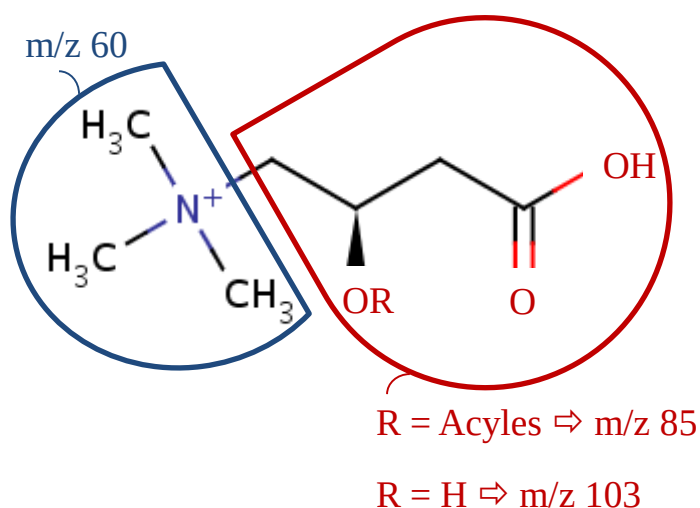


Figure 13 Interprétation des fragments obtenus après passage des carnitines dans la chambre de collision Q2 (**R**, chaîne carbonée de longueur variable pour les esters de carnitines ou atome d'hydrogène pour la carnitine ; **m/z**, masse/charge).

Composé	Formule	Masse (g/mol)	Ion parent (m/z)	Ion fils (m/z)	Tension de Fragmenteur (V)	Dwell time (ms)	Energie de Collision (eV)
Camitine	$\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_3$	161,1	162,1	103,1	120	100	16
				60,1	120	100	12
Camitine- d_3	$\text{D}_3\text{C}_7\text{H}_{12}\text{NO}_3$	164,1	165,1	103,1	120	100	16
				60,1	120	100	12
Acétyl-camitine	$\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_4$	203,1	204,1	85,0	95	100	16
				60,1	95	100	12
Lauroyl-camitine	$\text{C}_{19}\text{H}_{37}\text{NO}_4$	343,3	344,3	85,0	160	80	24
				60,1	160	80	20
Myristoyl-camitine	$\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{NO}_4$	371,3	372,3	85,0	160	80	24
				60,1	160	80	20
^{13}C -palmitoyl-camitine	$\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{NO}_4\text{D}_2$	403,4	404,4	85,0	170	80	28
				60,1	170	80	24
Palmitoyl-camitine	$\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{NO}_4$	399,3	400,3	85,0	165	80	28
				60,1	165	80	24
Stéaroyl-camitine	$\text{C}_{25}\text{H}_{49}\text{NO}_4$	427,4	428,4	85,0	165	80	24
				60,1	165	80	24
Oléoyl-camitine	$\text{C}_{25}\text{H}_{47}\text{NO}_4$	425,4	426,4	85,0	185	80	28
				60,1	185	80	24
Linoléoyl-camitine	$\text{C}_{25}\text{H}_{45}\text{NO}_4$	423,3	424,3	85,0	155	80	28
				60,1	155	80	24
Arachidoyl-camitine	$\text{C}_{27}\text{H}_{53}\text{NO}_4$	455,4	456,4	85,0	190	80	28
				60,1	190	80	24

Tableau 9 Paramètres de fragmentation des carnitines déterminés par le logiciel optimizer d'Agilent (**m/z**, masse/charge).

1.1.2. Paramètres de la source

En sortie de colonne de chromatographie, les composés sont conduits dans la source d'ions qui est un dispositif essentiel, dont l'optimisation des paramètres améliore la production de composés ionisés accessibles au spectromètre de masse. Au cours de toutes nos analyses, l'ionisation est réalisée par une source électrospray ou ESI, composée d'un module complémentaire Jetstream (Figure 14).

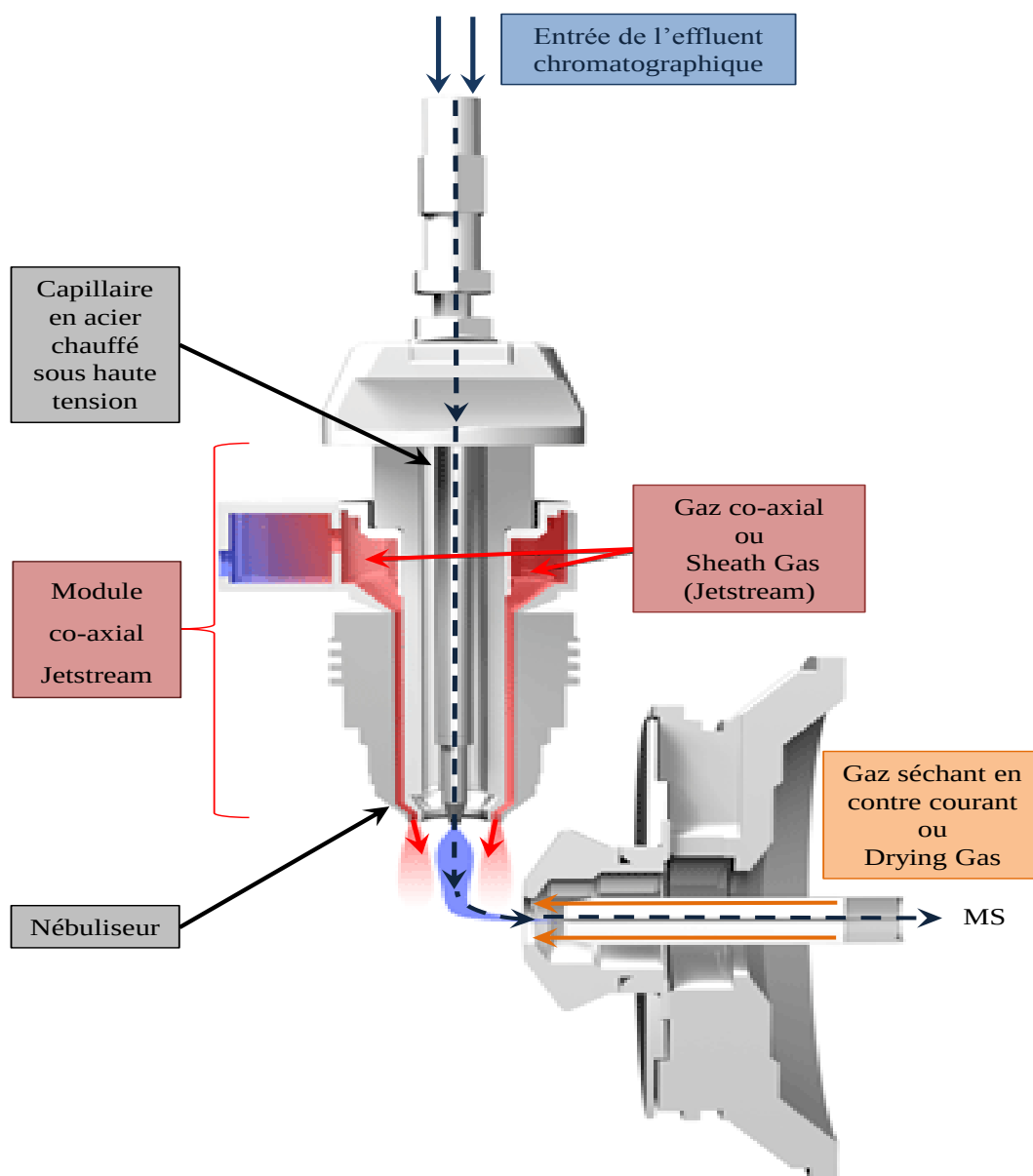


Figure 14 Illustration de la source électrospray ou ESI avec le module complémentaire Jetstream (Image extraite de www.Agilent.com).

Cet environnement stringent confine le flux d'électrospray pour améliorer le taux de désolvatation des ions et augmenter la production d'ions chargés accessibles au spectromètre de masse. Un mélange contenant de la carnitine et de l'acétyl-carnitine à 0,5 μM dans une solution de méthanol/eau (8/2 : v/v) a été préparé et analysé par infusion directe dans le spectromètre de masse. L'optimisation a été réalisée à partir des conditions d'origine recommandées par le constructeur, en changeant progressivement un paramètre à la fois. Nous avons sélectionné les conditions optimales permettant d'obtenir le signal le plus intense pour les transitions déterminées au préalable pour la carnitine et l'acétyl-carnitine (§ 1.1.1.) (Figure 15 et Tableau 10). En variant la température de 250°C à 400°C du gaz co-axial ou Sheath Gas Temp (azote gazeux) au niveau du module Jetstream, nous améliorons d'un coefficient de 3 la production d'ions chargés. L'optimisation progressive et confondue de tous les autres paramètres de source permet d'améliorer l'ionisation d'un coefficient de 1,3 en moyenne. Au final, en optimisant les paramètres de source, nous parvenons à un gain de sensibilité de 3,6 et de 3,9 respectivement pour la carnitine et l'acétyl-carnitine, alors que le constructeur Agilent annonce quant à lui, un gain général de sensibilité entre 5 à 10 par rapport à une ionisation électrospray conventionnelle.

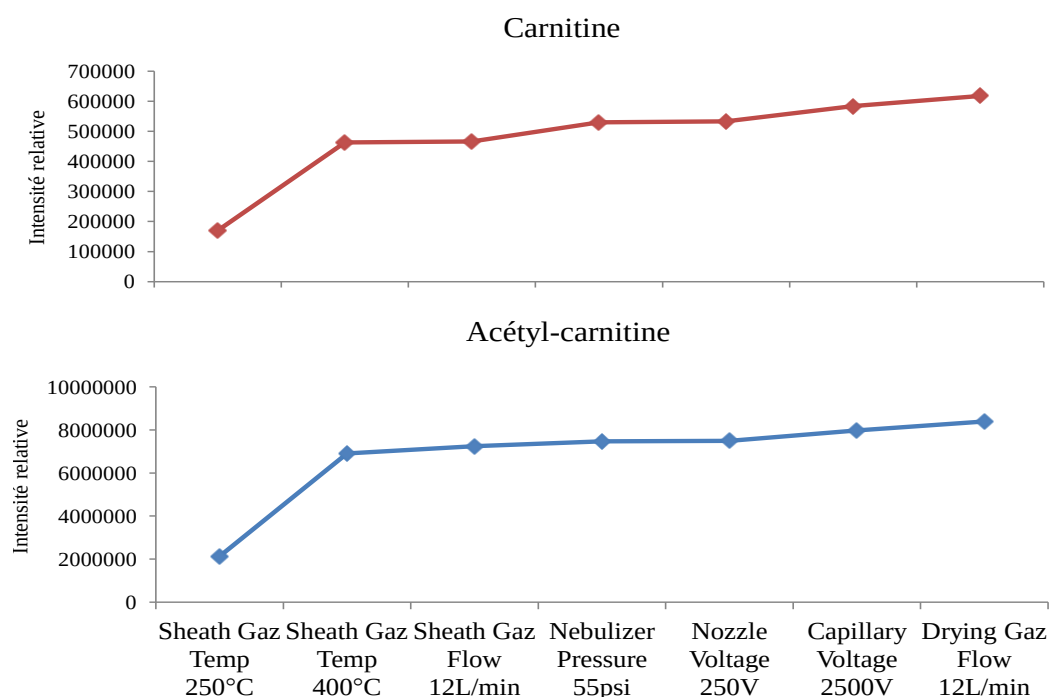


Figure 15 Evolution de l'intensité du signal des ions fils m/z 103 pour la carnitine et m/z 85 pour l'acétyl-carnitine en fonction des paramètres optimisés de la source.

Paramètre de la source	Conditions d'origine	Conditions optimisées
Sheath Gas Temp (°C)	250	400
Sheath Gas Flow (L/min)	11	12
Nebulizer Pressure (psi)	45	55
Nozzle Voltage (V)	500	250
Capillary Voltage (V)	4000	2500
Drying Gas Temp (°C)	300	300
Drying Gas Flow (L/min)	5	12

Tableau 10 Paramètres de la source avant et après optimisation. **Sheath Gas Temp/Flow** : température et flux du gaz co-axial amené par le module Jetstream ; **Nebulizer Pressure** : pression de nébulisation; **Nozzle Voltage** : tension de la buse de nébulisation ; **Capillary Voltage** : tension du capillaire ; **Drying Gas Temp/Flow** : température et flux de gaz desséchant amené en contre courant de l'aérosol généré en sortie du capillaire.

1.1.3. Conditions de séparation

1.1.3.1. Principe d'une séparation par une colonne de chromatographie de type HILIC

La méthode analytique mise en place par Bourdin *et al.* (2007) utilisait une colonne de chromatographie en phase inverse (avec des greffages de chaînes carbonées en C4:0 sur la silice) adaptée pour la séparation des molécules apolaires telles que les acyl-carnitines. En revanche, pour des molécules plus polaires, comme la carnitine ou l'acétyl-carnitine, l'ajout d'un agent de pair d'ions dans la phase mobile, tel que l'acide heptafluorobutyrique (HFBA) a été nécessaire pour améliorer leur rétention sur ce type de colonne. Malgré tout, la carnitine et l'acétyl-carnitine étaient peu retenues dans la colonne et co-éluait. De plus, l'utilisation d'un agent de pair d'ion a pour inconvénient de diminuer le rendement d'ionisation de ces molécules et pollue l'analyseur.

Pour toutes ces raisons, nous avons réalisé la séparation de la carnitine et de l'acétyl-carnitine avec une colonne de type HILIC qui est particulièrement adaptée à la séparation et l'analyse de molécules polaires (Figure 16).

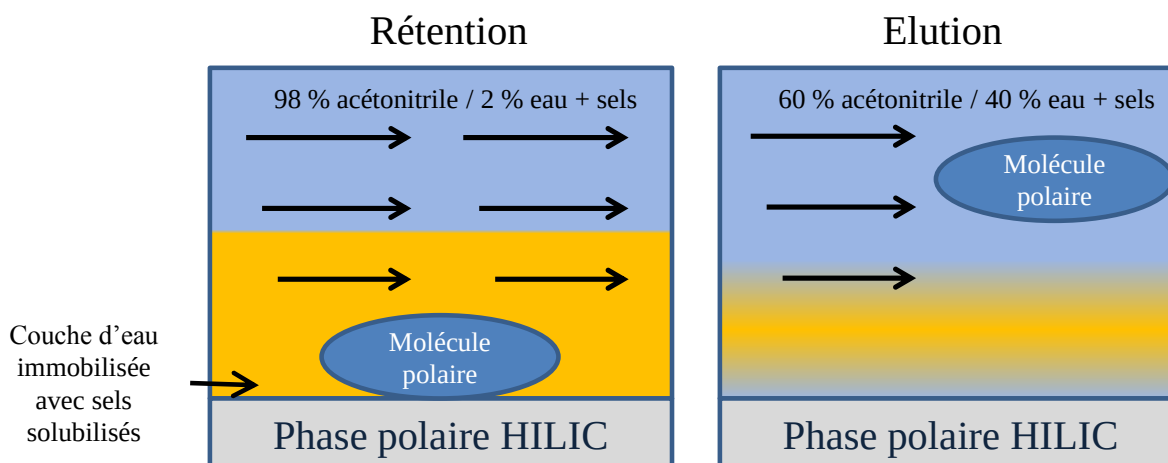


Figure 16 Schéma simplifié du principe de rétention et d'élution des composés polaires sur une colonne de type HILIC

Ainsi, la phase stationnaire utilisée est polaire (composée de silice non dérivatisée, d'amide, de diol...) et la phase mobile est moins polaire, (composée d'acétonitrile à 98 % et de 2 % d'eau + sels). Au cours de la séparation chromatographique, le pourcentage d'eau dans la phase mobile est augmenté graduellement (passant de 2 à 40 %) pour augmenter la polarité de la phase mobile et permettre l'élution progressive des analytes. La présence de sels (acétate ou formate d'ammonium) dans la phase aqueuse améliore également la rétention des analytes et la résolution des pics. En effet, les sels sont plus solubles dans l'eau que dans la phase mobile riche en solvant organique, et vont donc se concentrer dans la couche d'eau immobilisée à la surface de la phase stationnaire et améliorer les interactions ioniques avec les solutés chargés.

1.1.3.2. Séparation de la carnitine et de l'acétyl-carnitine sur colonne HILIC

Il existe un nombre important de colonnes HILIC sur le marché avec des matrices polaires différentes. Après l'évaluation des différentes colonnes HILIC disponibles au laboratoire, la colonne Kinetex de Phenomenex (2,6 μ m HILIC 100 A, 150 mm x 3,0 mm ; silice vierge non dérivatisée) apparaît comme la plus performante. Suite à l'optimisation des conditions chromatographiques (cf. §2.1.3.1. p 57). Cette colonne permet une bonne

séparation de l'acétyl-carnitine, la carnitine et la γ -butyrobétaïne (précurseur direct de la carnitine) avec des temps de rétention respectifs de 14,2, 15,4 et 17,4 min (Figure 17).



Figure 17 Chromatogrammes d'un mélange de standards à 5 pg/ μ L d'acétyl-carnitine, carnitine, carnitine- d_3 et de la γ -butyrobétaïne sur une colonne de type HILIC. Les pics représentent les transitions : **1** (204 > 60) et **2** (204 > 85) : acétyl-carnitine ; **3** (165 > 63) et **4** (165 > 103) : carnitine- d_3 ; **5** (162 > 60) et **6** (162 > 103) : carnitine ; **7** (146 > 60) et **8** (146 > 87) : γ -butyrobétaïne.

De plus, l'analyse de nos standards à 5 pg/ μ L permet d'obtenir des pics résolus avec des aires dont le rapport signal sur bruit de fond est supérieur à 200. Contrairement à une phase inverse, les colonnes en phase HILIC nécessitent un temps de stabilisation indispensable après

chaque analyse pour rééquilibrer la colonne. Nous avons établi le temps de stabilisation à 15 min, pour réduire au maximum les temps d'analyse, tout en gardant une bonne séparation des composés, des temps de rétention stables et une bonne résolution des pics associés.

1.1.3.3. Séparation des acyl-carnitines sur colonne HILIC

En parallèle, bien que les acyl-carnitines soient apolaires nous avons évalué leur comportement sur une colonne de type HILIC. Le protocole analytique développé pour la carnitine a été appliqué aux acyl-carnitines. De manière surprenante, le chromatogramme obtenu (Figure 18) montre que les acyl-carnitines interagissent avec la colonne HILIC et sont éluées entre 10 et 11 min en fonction de leur apolarité. Malgré une faible séparation des standards d'acyl-carnitines, une bonne résolution et des aires de pic avec un rapport signal sur bruit de fond supérieur à 200 sont observées. Les acyl-carnitines sont éluées lorsque la phase mobile contient près de 50 % d'acétonitrile. En ralentissant le gradient permettant de passer de 45 à 55 % d'acétonitrile, nous n'avons pas amélioré la séparation des acyl-carnitines. Les composés analysés ont un temps de rétention stable et reproductible, autour de 10 min pour les acyl-carnitines et entre 14-16 min pour les molécules polaires telles que l'acétyl-carnitine et la carnitine. Des segments de temps ont été placés au cours de l'analyse pour limiter le nombre de transitions analysé simultanément (cf. Tableau 7, p 51). Nous pouvons ainsi augmenter le nombre de point de mesures par transition (Dwell time), obtenir des pics plus résolus, tout en limitant une pollution inutile du spectromètre de masse.

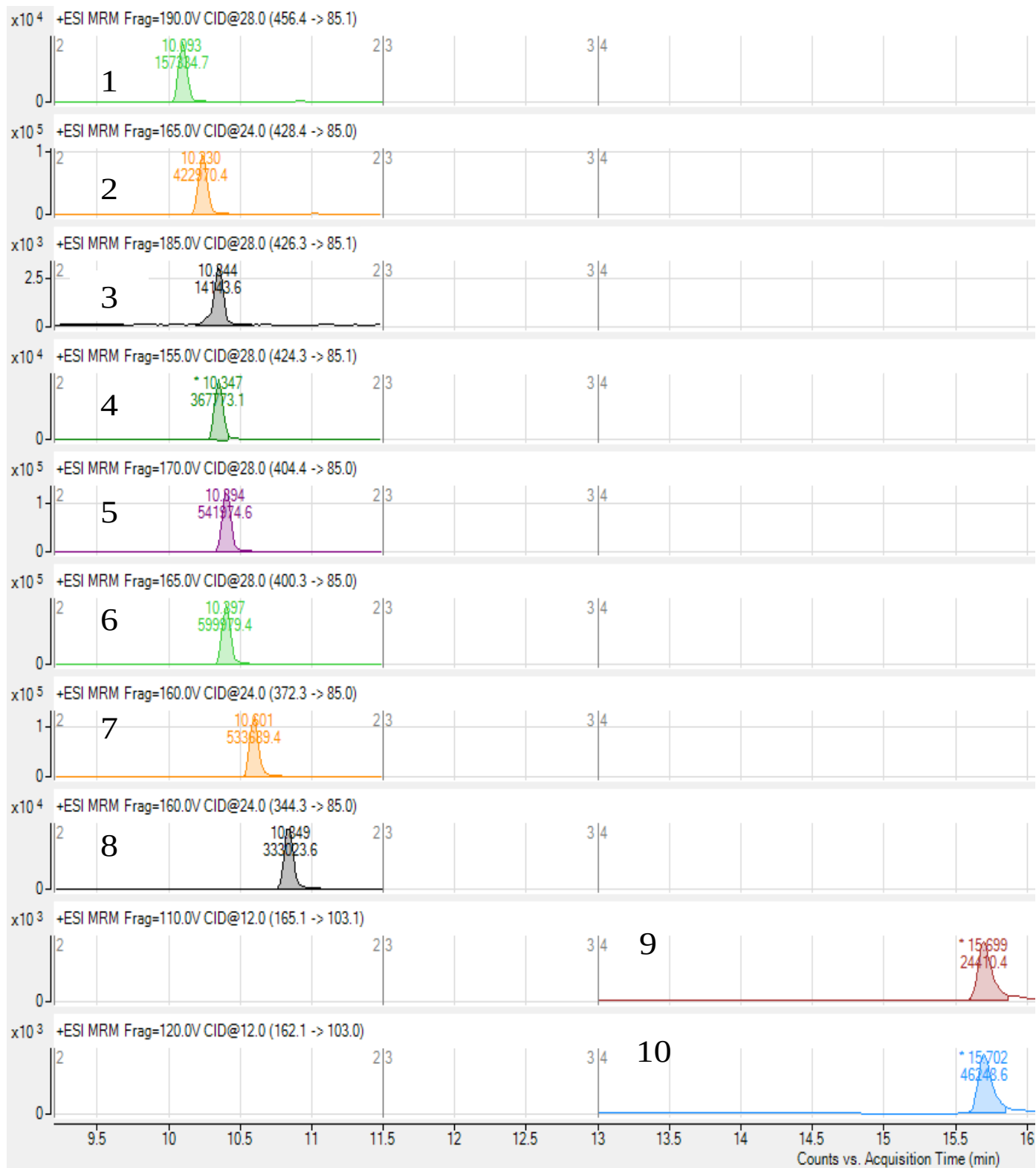


Figure 18 Chromatogrammes de standards de carnitines à 5 pg/ μL (la linoléoyl- et l'oléoyl-carnitine sont respectivement à 50 et 0,25 pg/ μL) sur colonne de type HILIC. Les pics représentent, **1** : arachidoyle-carnitine ; **2** : stéaroyl-carnitine ; **3** : linoléoyl-carnitine ; **4** : oléoyl-carnitine ; **5** : ^{13}C -palmitoyl-carnitine ; **6** : palmitoyl-carnitine ; **7** : myristoyl-carnitine ; **8** : lauroyl-carnitine ; **9** : carnitine- d_3 ; **10** : carnitine.

1.1.4. Quantification de la carnitine

Au cours de nos analyses, nous avons effectué une quantification par étalonnage interne. Contrairement à l'étalonnage externe, l'étalonnage interne n'est pas réalisé à partir d'une droite étalon de la molécule d'intérêt, mais est relative à une molécule de référence appelée étalon interne. Lors de la préparation, l'étalon interne est introduit dans l'échantillon à une concentration parfaitement définie et unique. L'étalon interne (souvent un isotope) qui a des propriétés physiques et chimiques proches voir identiques à l'analyte cible va subir les mêmes traitements et variations d'intensité (instrumentales, dues aux erreurs de prises d'échantillon, dilutions, effet matrice de l'extrait biologique). En travaillant avec le rapport des deux signaux (analyte cible et étalon interne), il est alors possible de s'affranchir de ces variations pour réaliser une quantification plus fiable.

1.1.4.1. Choix de l'étalon interne

Pour réaliser l'étalonnage interne de la carnitine, nous avons utilisé de la carnitine-d₃. Le deutérium (symbole ²H ou D) est un isotope naturel de l'hydrogène. Son noyau atomique, appelé deuton ou deutéron, possède un proton et un neutron, d'où un nombre de masse égal à 2. La carnitine deutérée a les mêmes propriétés physico-chimiques que la carnitine, mais 3 hydrogènes d'un groupement méthyle ont été substitués par 3 deutérium (Figure 19). Après ionisation, la carnitine et la carnitine deutérée ne diffèrent que par un m/z de 3, ce qui permet de les distinguer lors d'une analyse par MRM.

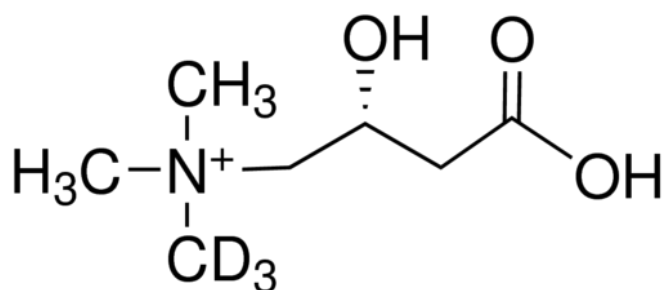


Figure 19 Représentation de la carnitine deutérée ou carnitine-d₃. Les 3 hydrogènes d'un groupement méthyle ont été substitués par 3 deutérium.

1.1.4.2. Etalonnage de la carnitine par rapport à la carnitine-d₃

Une gamme étalon contenant une concentration constante en carnitine-d₃ avec une concentration décroissante en carnitine a été réalisée (Tableau 11).

Etalon	1	2	3	4	5
Carnitine-d ₃ (pg/μL)	400	400	400	400	400
Carnitine (pg/μL)	80	40	8	4	2

Tableau 11 Préparation des étalons pour la détermination du coefficient de réponse de la carnitine par rapport l'étalon interne carnitine-d₃.

Nous avons ensuite analysé les mélanges et mesuré les intensités relatives de l'aire de pic de chaque analyte pour représenter la courbe suivante (Figure 20) :

$$I_{\text{carnitine}} / I_{\text{carnitine-d}_3} = f (Q_{\text{carnitine}} / Q_{\text{carnitine-d}_3}).$$

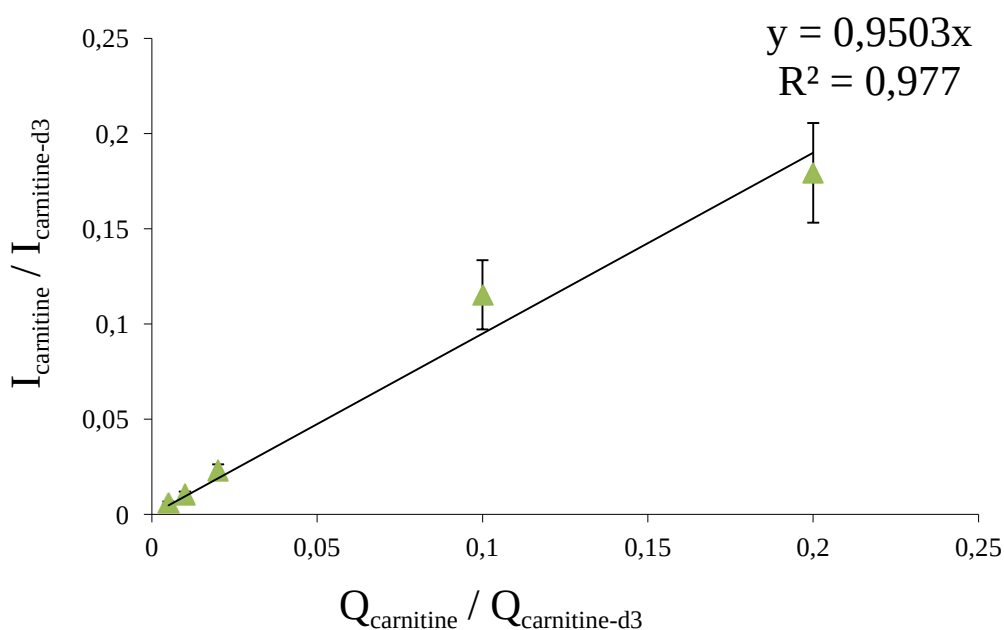


Figure 20 Courbe de calibration de la carnitine par étalonnage interne avec de la carnitine-d₃. (**I** : intensité relative de l'aire de pic du composé et **Q** : quantité connue de composé initialement apportée dans la solution).

Pour le calcul de la teneur de notre composé dans l'échantillon biologique, la formule suivante est appliquée :

$$Q_{\text{carnitine}} = (1 / Cr_{\text{carnitine/carnitine-d}_3}) \times (I_{\text{carnitine}} / I_{\text{carnitine-d}_3}) \times Q_{\text{carnitine-d}_3}$$

$I_{\text{carnitine}}$, $I_{\text{carnitine-d}_3}$: intensités mesurées respectives de la carnitine et de la carnitine-d₃.

$Q_{\text{carnitine-d}_3}$: quantité de carnitine-d₃ connue introduite avant traitement de l'échantillon.

$Cr_{\text{carnitine/carnitine-d}_3}$: coefficient de réponse de l'analyte par rapport à l'étalon interne, il s'agit ici du coefficient directeur de la droite représentée.

D'après, le coefficient directeur de la droite d'étalonnage, on considère que Cr a une valeur très proche de 1, on peut donc simplifier l'équation précédente:

$$Q_{\text{carnitine}} = (I_{\text{carnitine}} / I_{\text{carnitine-d}_3}) \times Q_{\text{carnitine-d}_3}$$

D'après la formule ci-dessus et connaissant, la quantité de carnitine-d₃ ajoutée en début d'extraction ($Q_{\text{carnitine-d}_3}$), l'intensité de l'aire de pic de la carnitine ($I_{\text{carnitine}}$) et de la carnitine deutérée ($I_{\text{carnitine-d}_3}$) mesurées par le spectromètre de masse, il est possible de déterminer la teneur en carnitine ($Q_{\text{carnitine}}$) de l'extrait végétal. Dans nos conditions d'analyse, nous avons une linéarité de la réponse pour des teneurs en carnitine entre 2 et 80 pg/μL.

1.1.5. Quantification des acyl-carnitines

1.1.5.1. Choix de l'étalon interne

Pour réaliser l'étalonnage interne des acyl-carnitines, nous avons choisi d'utiliser la ¹³C-palmitoyl-carnitine contenant 4 atomes de ¹³C qui est un isotope stable et naturel du ¹²C. Ainsi, la ¹³C-palmitoyl-carnitine et la palmitoyl-carnitine ne diffèrent que par un m/z de 4, ce qui permet de les distinguer lors d'une analyse par MRM (Figure 21).

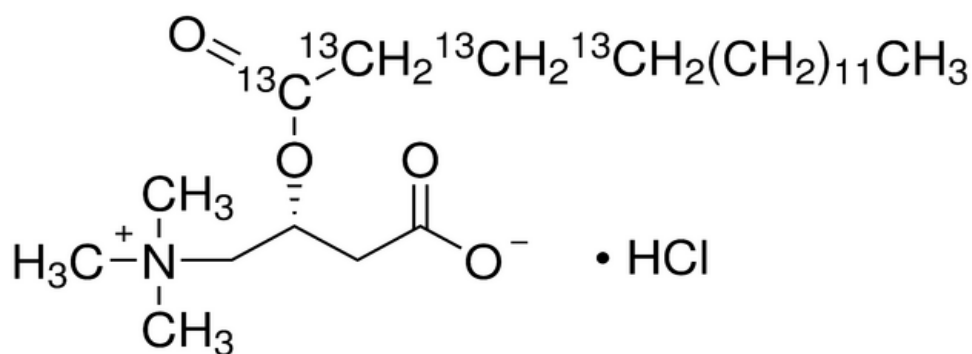


Figure 21 Représentation de la ^{13}C -palmitoyl-carnitine. Quatre atomes de ^{12}C de la chaîne carbonée issue du palmitate sont substitués par 4 ^{13}C .

1.1.5.2. Etalonnage des acyl-carnitines par rapport à la ^{13}C -palmitoyl-carnitine

Nous avons préparé et mesuré les intensités relatives d'étalons contenant une concentration constante en ^{13}C -palmitoyl-carnitine avec une concentration décroissante en palmitoyl-carnitine (Tableau 12).

Etalon	1	2	3	4	5
^{13}C -palmitoyl-carnitine (fg/ μL)	400	400	400	400	400
Palmitoyl-carnitine (fg/ μL)	80	40	8	4	2

Tableau 12 Préparation des étalons pour la détermination du coefficient de réponse du palmitoyl-carnitine par rapport l'étalon interne ^{13}C -palmitoyl-carnitine

Après analyse de la gamme étalon, nous représentons (Figure 22) :

$$I_{\text{palmitoyl-carnitine}} / I^{13}_{\text{C-palmitoyl-carnitine}} = f (Q_{\text{palmitoyl-carnitine}} / Q^{13}_{\text{C-palmitoyl-carnitine}})$$

Comme pour la carnitine, le coefficient directeur de la droite d'étalonnage est de 0,93, que nous avons assimilés à 1 pour simplifier les calculs. La quantification des acyl-carnitines est effectuée avec la formule suivante :

$$Q_{\text{palmitoyl-carnitine}} = (I_{\text{palmitoyl-carnitine}} / I^{13}_{\text{C-palmitoyl-carnitine}}) \times Q^{13}_{\text{C-palmitoyl-carnitine}}$$

Malgré une faible séparation des acyl-carnitines sur une colonne HILIC développée spécifiquement pour les molécules polaires, nous obtenons des pics résolus avec une linéarité de la réponse entre 2 et 80 fg/ μ L.

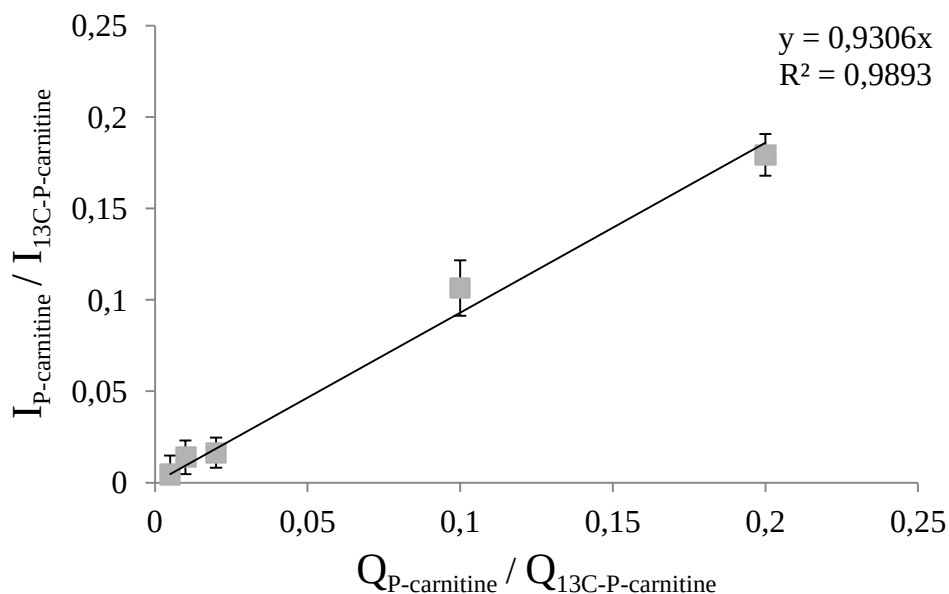


Figure 22 Courbe de calibration du palmitoyl-carnitine par étalonnage interne avec du ^{13}C -palmitoyl-carnitine (**I** : intensité relative de l'aire de pic du composé et **Q** : quantité connue de composé initialement apportée dans la solution).

1.1.6. Analyse d'un extrait de plantules d'Arabidopsis par LC-QQQ-MS/MS

Pour valider la méthode analytique mise en place, nous avons réalisé une extraction méthanol/eau (v/v, 8/2) sur des plantules d'Arabidopsis à de 2 j de développement post-imbibition avec ajout de standards interne (^{13}C -palmitoyl-carnitine à 5 pg/mg MS et carnitine- d_3 à 5 ng/mg MS), et analysé l'extrait par LC-QQQ-MS (Figure 23). Dans cet extrait végétal, nous observons des pics avec des temps de rétention correspondants à l'arachidoyle-, la stéaroyle-, l'oléoyl-, la ^{13}C -palmitoyl-, la palmitoyl-, la myristoyl-, la lauroyl-carnitine, la carnitine- d_3 et la carnitine. Le calcul du rapport des intensités des 2 transitions déterminées pour chaque composé est une constante et permet de confirmer l'identité des composés. Concernant, l'acétyl-carnitine, nous distinguons un pic au bon temps de rétention, mais qui se situe dans le bruit de fond. Au niveau des transitions correspondantes à la linoléoyl-carnitine, nous observons des pics assimilables à cette dernière.

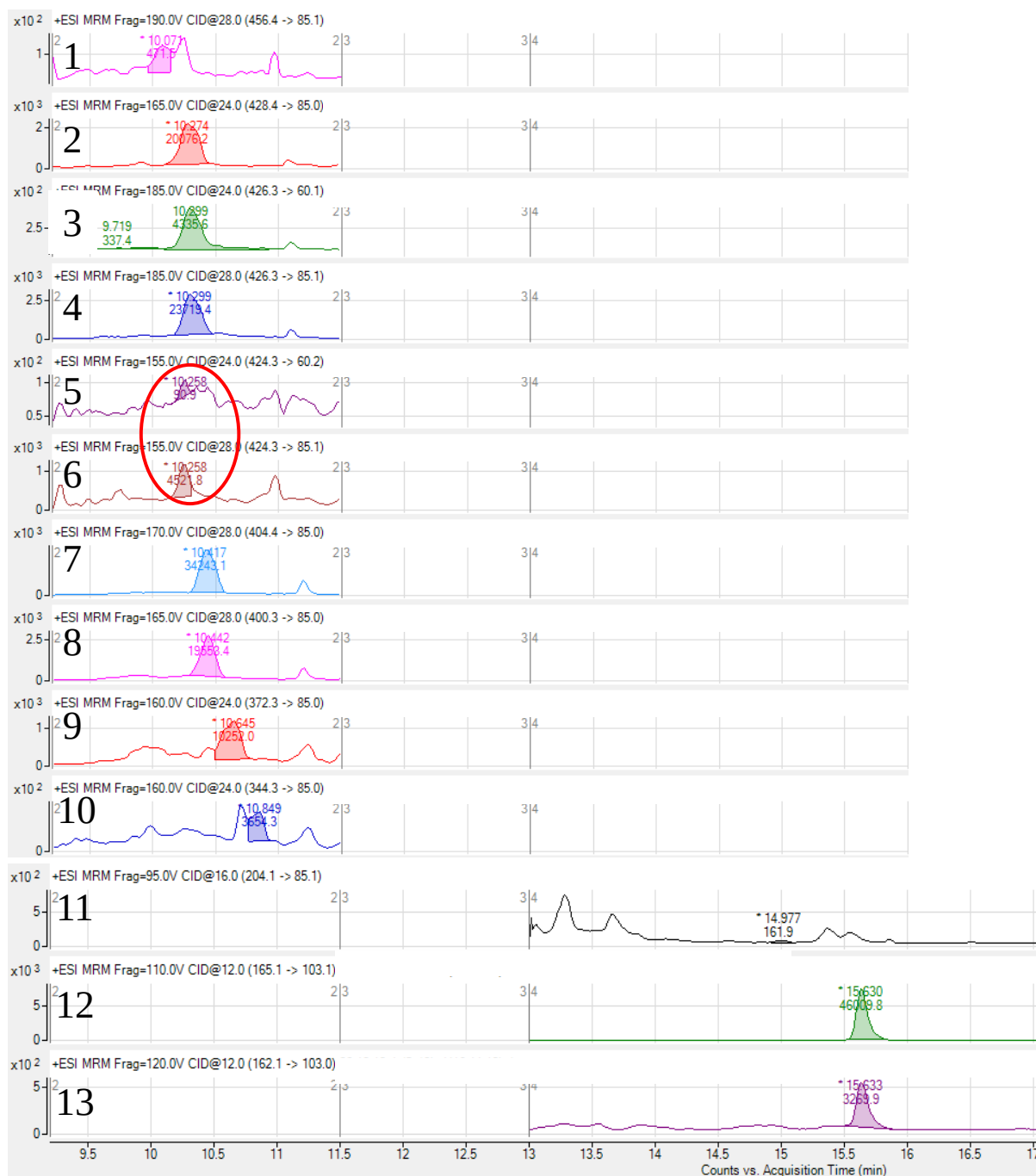


Figure 23 Chromatogrammes d'un extrait de plantules d'*A. thaliana* à 2 j post-imbibition de développement traité au méthanol/eau (8/2 : v/v) avec ajout de standards interne (^{13}C -palmitoyl-carnitine à 5 pg/mg MS et la carnitine- d_3 à 5 ng/mg MS) et analysé par LC-QQQ-MS/MS avec une colonne de type HILIC. Les pics représentent, **1** : arachidoyl-carnitine ; **2** : stéaroyl-carnitine ; **3** et **4** transitions $426 > 60$ et $426 > 85$ m/z de l'oléoyl-carnitine ; **5** et **6** transitions $424 > 60$ et $424 > 85$ m/z du linoléoyl-carnitine (pics parasites) ; **7** : ^{13}C -palmitoyl-carnitine ; **8** : palmitoyl-carnitine ; **9** : myristoyl-carnitine ; **10** : lauroyl-carnitine ; **11** : acétyl-carnitine ; **12** : carnitine- d_3 ; **13** : carnitine.

Pourtant, lorsque nous comparons le temps de rétention par rapport au standard de linoléoyl-carnitine (cf. Figure 18, p 74), nous observons que cette dernière devrait co-éluer avec l'oléoyl-carnitine, or ce n'est pas le cas, les temps de rétention sont différents.

D'autre part, en calculant le rapport d'intensité des transitions 85 et 60 qui est de l'ordre de 5,5 pour la linoléoyl-carnitine, nous obtenons ici 50. Ainsi, dans nos conditions d'analyse, la linoléoyl-carnitine n'est pas détectable dans l'extrait végétal, alors que Bourdin *et al.* (2007), en avait mesurée dans différents extraits végétaux (d'*Arabidopsis*, de colza, de lin et de tabac) avec une étape d'extraction identique et un couplage similaire de type LC-QQQ-MS. En revanche, à l'époque l'appareillage même ne permettaient pas de traiter un nombre important de transitions simultanément. Ainsi, la quantification des acyl-carnitines par MRM ne se faisait uniquement qu'avec la transition m/z 85 et un pic parasite auraient pu être considéré comme de la linoléoyl-carnitine.

D'autre part, lors d'une étude visant à déterminer l'emplacement des doubles liaisons des AG méthyl-estérifiées (FAME), il a été montré que le rendement d'une ionisation chimique à pression atmosphérique ou APCI, est dépendant du nombre d'insaturations, leur position et la longueur de la chaîne carbonée (Vrkoslav & Cvačka, 2012). Il apparaît donc que le mode d'ionisation pourrait interférer sur le rendement d'ionisation de composés insaturés tels que la linoléoyl-carnitine ou l'oléoyl-carnitine.

1.1.7. Détermination des coefficients d'ionisation de la stéaroyl-, de l'oléoyl- et de la linoléoyl-carnitine par rapport à l'étalon interne ^{13}C -palmitoyl-carnitine.

Nous avons souhaité étudier l'influence du nombre d'insaturation sur le rendement d'ionisation d'un composé par électrospray. Pour ce faire, nous avons comparé le coefficient d'ionisation de la stéaroyl-, l'oléoyl- et la linoléoyl-carnitine par rapport à l'étalon interne ^{13}C -palmitoyl-carnitine. Plus le coefficient d'ionisation déterminé est proche de 1, plus le comportement en terme d'ionisation d'un analyte cible par rapport à son étalon interne est proche. A partir de solutions nouvellement préparées, nous avons donc analysé des mélanges équimolaires à 50 nM par infusion direct dans le spectromètre de masse de [^{13}C -palmitoyl-carnitine/stéaroyl-carnitine], [^{13}C -palmitoyl-carnitine/oléoyl-carnitine] et de [^{13}C -palmitoyl-carnitine/linoléoyl-carnitine]. Nous avons ensuite calculé le rapport de l'intensité des aires de pic correspondant pour définir leur coefficient d'ionisation respectif (Tableau 13).

Mélange	Aire de pic ¹³ C- C16:0-carnitine [1]	Aire de pic C18:0-carnitine [2]	Coefficient d'ionisation rapport [1] / [2]
1	1746456	1529194	1,14
2	1814625	1644780	1,10
3	1752448	1576797	1,11
		Moyenne	1,12
		Ecart type	0,02

Mélange	Aire de pic ¹³ C- C16:0-carnitine [1]	Aire de pic C18:1-carnitine [2]	Coefficient d'ionisation rapport [1] / [2]
1	1803273	864570	2,09
2	1807266	825916	2,19
3	1791467	814223	2,20
		Moyenne	2,16
		Ecart type	0,06

Mélange	Aire de pic ¹³ C- C16:0-carnitine [1]	Aire de pic C18:2-carnitine [2]	Coefficient d'ionisation rapport [1] / [2]
1	1557564	103821	15,00
2	1574424	104771	15,03
3	1548562	101475	15,26
		Moyenne	15,10
		Ecart type	0,14

Tableau 13 Coefficient d'ionisation de la stéaroyl-, l'oléoyl- et linoléoyl-carnitine par rapport au standard interne ¹³C-palmitoyl-carnitine. Des mélanges équimolaires à 50 nM ont été préparés et analysés par infusion direct dans le spectromètre de masse

Le calcul des coefficients d'ionisation de la stéaroyl-, oléoyl- et linoléoyl-carnitine, montre qu'elles sont respectivement 1,1, 2,2 et 15,1 fois moins ionisées que la ¹³C-palmitoyl-carnitine, pour une même concentration initiale. Ainsi, ces résultats suggèrent que la stéaroyl-carnitine a un comportement en terme d'ionisation qui est très proche de l'étalon interne. A concentration égale, les acyl-carnitines contenant des insaturations telles que l'oléoyl- et la linoléoyl-carnitine présentent des rendements d'ionisation par électrospray beaucoup plus faibles que la stéaroyl-carnitine. Les coefficients d'ionisation déterminés ont été intégrés dans la quantification respective de ces acyl-carnitines au cours de nos travaux.

Discussion :

L'optimisation successive des conditions de fragmentation, de source et des paramètres HPLC/HILIC, nous a permis de mettre au point une méthode analytique fiable. L'acétyl-carnitine et la carnitine qui n'étaient pas séparées sur colonne en phase inverse (Bourdin *et al.*, 2007), sont à présent parfaitement dissociables avec des temps de rétention stables. Les acyl-carnitines qui sont apolaires sont retenues sur cette colonne polaire de type HILIC, mais présentent une mauvaise séparation qu'il n'a pas été possible d'optimiser. De plus, grâce à l'utilisation d'étalons internes, l'absence d'agent de pair d'ions dans la phase mobile, une bonne rétention et séparation de nos composés, nous pouvons quantifier la carnitine et les esters de carnitine en une seule analyse avec une grande sensibilité et une bonne répétabilité. Avec notre méthode, nous avons une limite de dosage de 2 pg/μL pour la carnitine et de 2 fg/μL pour les acyl-carnitines. Cependant, notons que ces limites ont été déterminées avec des solutions pures de standards, alors que les extraits biologiques renferment un mélange beaucoup plus complexe de molécules, qui provoque une diminution des signaux de l'ordre de 20 %. Malgré tout, nous sommes en mesure de quantifier les carnitines dans les tissus végétaux, dont les teneurs sont au moins 10 fois plus élevées que les limites de dosage déterminées. Enfin, notre méthode analytique corrobore les travaux publiés récemment par Kivilompolo *et al.* (2013) concernant la quantification de carnitine et des acyl-carnitines dans le serum humain et des tissus de rat grâce au couplage LC/HILIC-MS/MS.

2. EVOLUTION DES TENEURS EN CARNITINES AU COURS DU DEVELOPPEMENT NORMAL

2.1. Développement post-germinatif

Le développement post-germinatif constitue une phase du processus de germination au sens large, au cours de laquelle le développement de la plantule repose sur l'utilisation des réserves de la graine. Dans le cas des espèces oléagineuses, dont *Arabidopsis*, la réserve majoritaire en énergie et en carbone est constituée des triglycérides stockés dans les globules lipidiques. Le catabolisme des triglycérides va ainsi permettre l'alimentation de la plantule en développement avant que l'acquisition de la capacité photosynthétique ne lui confère une autotrophie complète. Au cours du développement post-germinatif, l'émergence et la croissance des cotylédons exposés à la lumière s'accompagne d'une acquisition progressive de la photo-autotrophie visualisable par leur verdissement. Une étude antérieure menée par

l'équipe avait montré une fluctuation des teneurs en carnitine libre et en acyl-carnitines au cours de la germination d'*Arabidopsis* (Bourdin *et al.*, 2007). L'optimisation du dosage de la carnitine et des acyl-carnitines menée dans le cadre de cette thèse et décrite précédemment nous a permis d'affiner les résultats relatifs à la phase de post-germination afin d'associer éventuellement la présence d'acyl-carnitines à un processus lipidique particulier. Les teneurs en carnitine et acyl-carnitines ont ainsi été mesurées pendant la première semaine de développement *in vitro* de plantules d'*Arabidopsis* sur milieu M&S, tous les jours pendant la phase post-germinative (de 1 à 4 jours post-imbibition) puis à 7 jours. Dans nos conditions de culture, le stade de 4 j correspond à la fin de la phase post-germinative visualisable par l'émergence du premier bourgeon foliaire. A 7 j, le stade post-germinatif est dépassé et la première paire de feuilles, totalement émergée, est en cours de développement.

2.2. Analyse des carnitines

2.2.1. Analyse des fractions libre et estérifiée de la carnitine

Pour rappel, la carnitine libre représente la fraction obtenue sans traitement de saponification au cours du procédé d'extraction alors que la fraction estérifiée est obtenue sur un extrait végétal, provenant du même matériel biologique par le procédé d'extraction auquel est ajouté un traitement de saponification permettant la libération de la carnitine estérifiée.

Les résultats des dosages montrent que la teneur en carnitine totale (fraction libre + fraction estérifiée) évolue au cours du développement (Figure 24, encart). Pour des plantules de 1, 4 et 7 j, la teneur en carnitine totale est du même ordre (environ 400 pg/mg MS), avec une représentation minoritaire de la fraction estérifiée. Pour des plantules à 2 et 3 j de développement, nous mesurons une augmentation significative de la teneur en carnitine totale (environ 1200 pg/mg MS) correspondant à un triplement des concentrations endogènes par rapport aux autres stades de développement. On peut observer que pour ces 2 stades, la distribution de la carnitine entre les fractions libre et estérifiée subit un changement drastique, avec une légère prépondérance de la fraction estérifiée à 2 j de développement alors qu'à 3 j la fraction libre est nettement majoritaire et la fraction liée est très peu représentée.

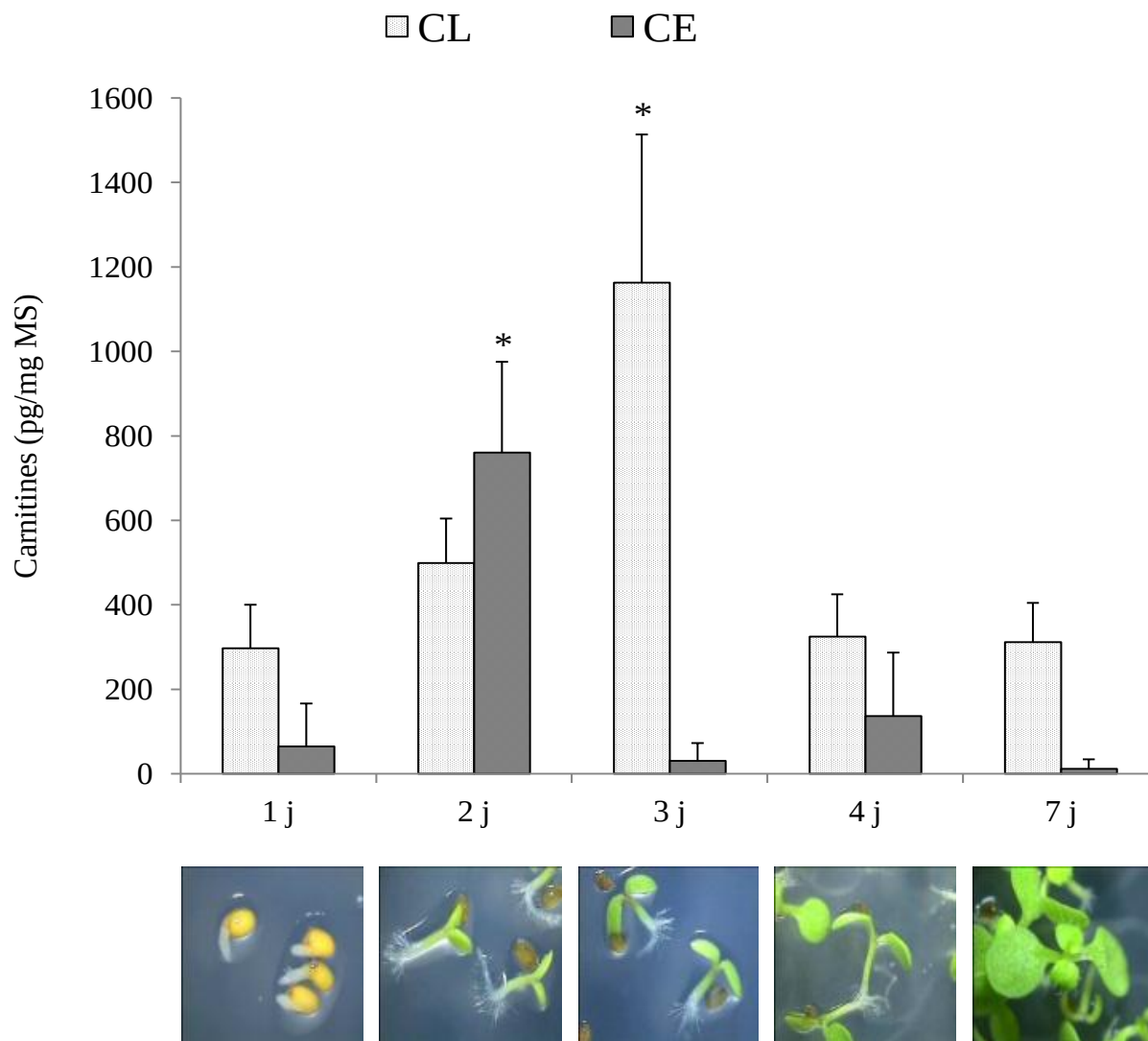


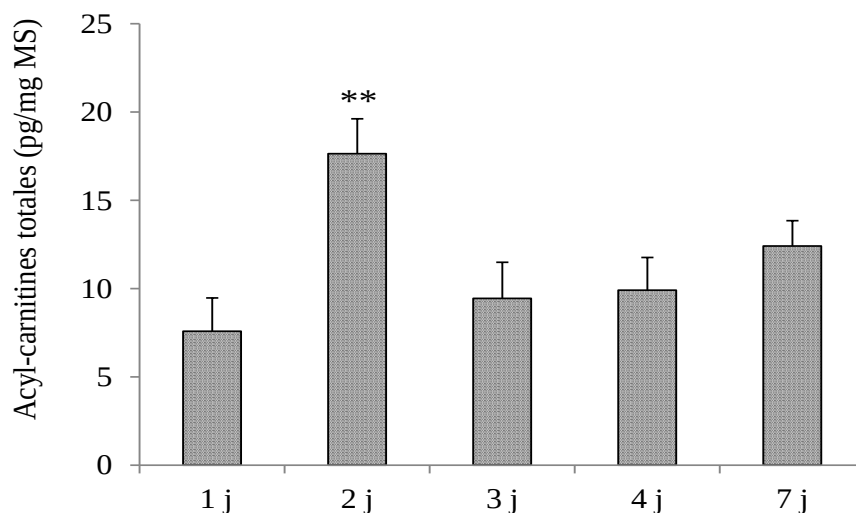
Figure 24 Evolution de la teneur totale en carnitine (CT, encart de la figure) et des fractions de carnitine libre (CL) et estérifiée (CE) au cours du développement post-germinatif de plantules d'*Arabidopsis* (écotype WS) cultivées *in vitro* sur milieu M&S, entre 1 j et 7 j de développement post-imbibition. Les valeurs sont exprimées en pg/mg de matière sèche et représentent la moyenne $\pm$ écart-type des résultats de cinq expérimentations biologiquement indépendantes. Une analyse de variance (one-way ANOVA) indique que les valeurs marquées avec un ou plusieurs astérisques sont significativement différentes de celles des autres groupes analysés. Le seuil de significativité est défini par la valeur de P avec * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ et *** = $P < 0,001$.

2.2.2. Analyse des acyl-carnitines

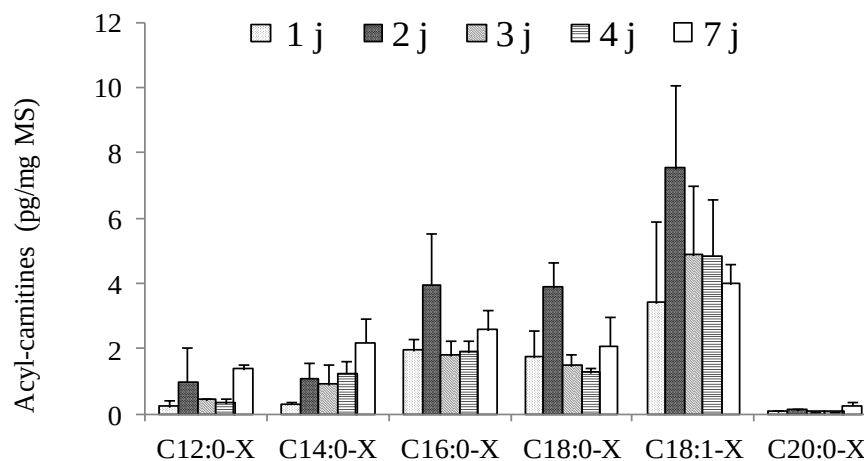
Afin d'affiner notre analyse des différentes fractions de carnitine, et de leur fluctuation au cours du développement post-germinatif, nos dosages ont aussi porté plus spécifiquement sur les acyl-carnitines, à partir des extraits n'ayant pas subi de traitement de saponification et

en parallèle au dosage de la fraction de carnitine libre. L'analyse n'a pas porté sur l'octanoyl- et la décanoyl-carnitine, qui s'étaient révélées très peu présentes lors des travaux de thèse de B. Bourdin (2007), afin de limiter le nombre de transitions analysées pour ne pas affecter la

A



B



X = carnitine

sensibilité de détection des acyl-carnitines majoritaires.

Figure 25 Evolution de la teneur en acyl-carnitines (**A** : teneur cumulée de toutes les entités dosées ; **B** : teneur spécifique de chaque entité) au cours du développement post-germinatif de plantules d'*Arabidopsis* (écotype WS) cultivées *in vitro* sur milieu M&S, entre 1 j et 7 j de développement post-imbibition. Les valeurs sont exprimées en pg/mg de matière sèche et représentent la moyenne $\pm$ écart-type des résultats de cinq expérimentations biologiquement indépendantes. Une analyse de variance (one-way ANOVA) indique que les valeurs marquées

avec un ou plusieurs astérisques sont significativement différentes de celles des autres groupes analysés. Le seuil de significativité est défini par la valeur de P avec * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ et *** = $P < 0,001$.

Les résultats révèlent une augmentation significative de la teneur cumulée en acyl-carnitines entre 1 et 2 j de développement (Figure 25A). Cette augmentation n'est pas maintenue aux stades ultérieurs de développement et dès 3 j, les plantules présentent à nouveau une teneur en acyl-carnitines comparable à celle mesurée à 1 jour. Ce profil d'évolution est similaire à celui mesuré pour la fraction de carnitine estérifiée. Toutefois, la teneur en acyl-carnitines est très inférieure à la teneur en carnitine estérifiée à tous les stades de développement analysés. Ainsi, le pourcentage massique du pool des acyl-carnitines analysées fluctue entre les différents stades de développement : 2 % à 1 j, 1 % à 2 j, 12 % à 3 j, 3 % à 4 j, 11 % à 7 j.

L'analyse de la composition en acyl-carnitines montre que la carnitine est associée avec des AG de longueurs de chaîne variable, de 12 à 20 carbones (Figure 25B). Concernant l'association aux AG à longue chaîne, l'oléoyl-carnitine (C18:1) est la plus représentée. Les teneurs en palmitoyl-carnitine (C16:0) et en stéaroyl-carnitine (C18:0) sont plus faibles et équivalentes entre elles. L'arachidoyl-carnitine (C20:0) est très peu présente, à la limite du seuil de détection. Concernant les AG à chaîne moyenne, la présence de myristoyl-carnitine (C14:0) est notable mais de la lauroyl-carnitine (C12:0) est aussi quantifiée. L'évolution des teneurs en acyl-carnitines au cours de la phase post-germinative reflète l'évolution des teneurs en palmitoyl-, stéaroyl- et oléoyl-carnitine. Notons que de l'acétyl-carnitine est quantifiable dans tous nos échantillons, mais à des teneurs très fluctuantes allant de 0,4 à 3,5 pg/mg MS.

Discussion :

Les résultats de cette étude mettent en lumière une intervention de la carnitine dans des processus physiologiques associés au développement post-germinatif d'*Arabidopsis*. Ceci confirme et précise des données antérieures obtenues dans le laboratoire dans le cadre de la thèse de Benoîte Bourdin en 2007. De nos résultats actuels, il apparaît que les plantules en développement s'enrichissent en acyl-carnitines au début de la phase post-germinative. En effet une analyse en Northern blots de l'expression de marqueurs du catabolisme des TAG (gène de la kétoacyl-CoA thiolase 2 pour la β -oxydation, et gènes de l'isocitrate lyase et de la malate synthase pour le cycle glyoxylique) avait permis de situer le début de la phase post-germinative d'*Arabidopsis* dès 1 j de développement dans nos conditions de culture (Thèse B.

Bourdin, 2007). Une analyse parallèle de la teneur en TAG indiquait la complétion de la post-germination à 4 j avec la disparition totale des TAG entre 3 et 4 j de développement. De ce point de vue, nos résultats pourraient indiquer un lien entre la présence d'acyl-carnitines et le catabolisme des TAG, dans le cadre de la β -oxydation par exemple. Cette hypothèse a été creusée par une expérimentation utilisant un milieu de culture abolissant la synthèse des TAG dont les résultats sont présentés au paragraphe suivant.

D'un autre point de vue, la phase post-germinative correspond aussi à un développement accrue de la plantule et à un cheminement vers l'acquisition de la photo-autotrophie par la mise en place de l'appareil photosynthétique. D'ailleurs, l'analyse de l'expression de marqueurs de la capacité photosynthétique (gène de la RUBISCO pour le cycle de Calvin, de la chlorophylle synthase pour la maturation des chloroplastes, de l'hydroxypyruvate reductase pour la photorespiration) situait l'initiation du processus d'acquisition de la photosynthèse dès 2 j de développement (Thèse B. Bourdin, 2007). La recrudescence des acyl-carnitines à 2 j, alors que les cotylédons ont émergés et démarrent leur expansion, pourrait donc aussi indiquer l'intervention des acyl-carnitines dans la synthèse des lipides pour la formation des membranes, notamment plastidiales. Cette hypothèse a été évaluée dans le cadre d'une expérimentation d'étiollement présentée plus loin (cf. § 2.4).

L'analyse des acyl-carnitines révèle une prépondérance de l'oléoyl-carnitine, et en teneurs moindres, de la palmitoyl-carnitine et de la stéaroyl-carnitine. La quantification de l'oléoyl-carnitine n'avait pas été possible par la méthodologie antérieure développée au laboratoire, le standard commercial n'étant alors pas disponible (Bourdin *et al.*, 2007). Cette nouvelle donnée permet maintenant d'envisager la concomitance de ces 3 acyl-carnitines comme une indication de l'implication de la carnitine dans l'exportation des AG nouvellement synthétisés, des plastes vers le cytosol, pour alimenter la voie eucaryotique de la synthèse lipidique. En effet, l'oléate et dans une moindre mesure le palmitate et le stéarate sont les AG exportés du plaste pour alimenter la voie eucaryotique (Ohlrogge & Browse, 1995 ; Li-Besson *et al.*, 2010). Cette hypothèse a fait l'objet d'une analyse sur l'évolution de l'expression de gènes marqueurs des différentes voies de synthèse lipidiques au cours du développement précoce, présentée plus loin (cf. § 2.5).

La présence d'acétyl-carnitine dans nos échantillons corrobore les activités carnitine acétyl-transférase mesurées dans des extraits mitochondriaux de cotylédons et plastidiaux de

feuilles de pois ou bien dans des étio-chloroplastes de feuilles d'orge en verdissement (Thomas *et al.*, 1983 ; Burgess & Thomas, 1986 ; Masterson & Wood, 2000b). Les teneurs sont fluctuantes suggérant que ce composé pourrait être une forme de réserve d'acétate métabolisée en fonction des besoins de la plante et/ou permettrait de tamponner le ratio acétyl-CoA/CoA pour le maintien d'un pool suffisant de coenzyme A dans la mitochondrie (Ramsay & Zammit, 2004 ; Stephens *et al.*, 2007). La présence d'acétyl-carnitine pourrait également être reliée à un processus d'exportation d'acétate activé à partir du peroxysome dans le cadre de la β -oxydation peroxysomale, ou de la mitochondrie dans l'hypothèse d'une β -oxydation mitochondriale.

L'adaptation d'une méthode d'extraction permettant de doser la fraction de carnitine estérifiée en complément du dosage des acyl-carnitines a produit un résultat inédit. Il apparaît clairement que la carnitine ne s'estérifie pas uniquement aux AG, mais qu'au contraire, une très large fraction s'estérifie à d'autres acides organiques. Bien que des pics suggérant la présence de linoléoyl-carnitine aient pu être détectés dans nos extraits végétaux, nos dosages n'ont pas permis de la quantifier de manière précise et répétable. En effet, dans nos conditions d'analyse, le seuil limite de quantification de la linoléoyl-carnitine est plus élevé que pour les acyl-carnitines saturés ou que pour l'oléoyl-carnitine, du fait d'un très faible facteur de réponse à l'ionisation, attribuable aux insaturations (cf. §1.1.7. p 80). Cette limitation est probablement transposable à la linolényl-carnitine, encore plus insaturée. Il n'est donc pas à exclure qu'une partie de la fraction de carnitine estérifiée soit constituée d'acyl-carnitines non quantifiées lors de nos analyses, correspondant à des AG insaturés ou encore atypiques. La détermination des composants de cette fraction a fait l'objet d'une expérimentation décrite plus loin.

2.3. Perturbation du catabolisme des TAG

Nous avons étudié les différentes fractions de carnitine dans des plantules dont le catabolisme des TAG est abolit afin d'évaluer notamment la contribution des acyl-carnitines dans ce processus métabolique du développement post-germinatif. Un milieu M&S modifié (MSM) a été utilisé, qui inhibe la mobilisation des réserves du fait d'un appauvrissement en azote et d'un enrichissement en saccharose (Martin *et al.*, 2002). Les teneurs des différentes fractions de carnitine ont été comparées entre des plantules cultivées sur milieu M&S et des plantules cultivées sur milieu MSM (Figure 26). A noter que les expérimentations ont été

effectuées en parallèle sur le mutant *oct1-1* mais les résultats, comparables à ceux obtenus avec WS, ne sont pas présentés.

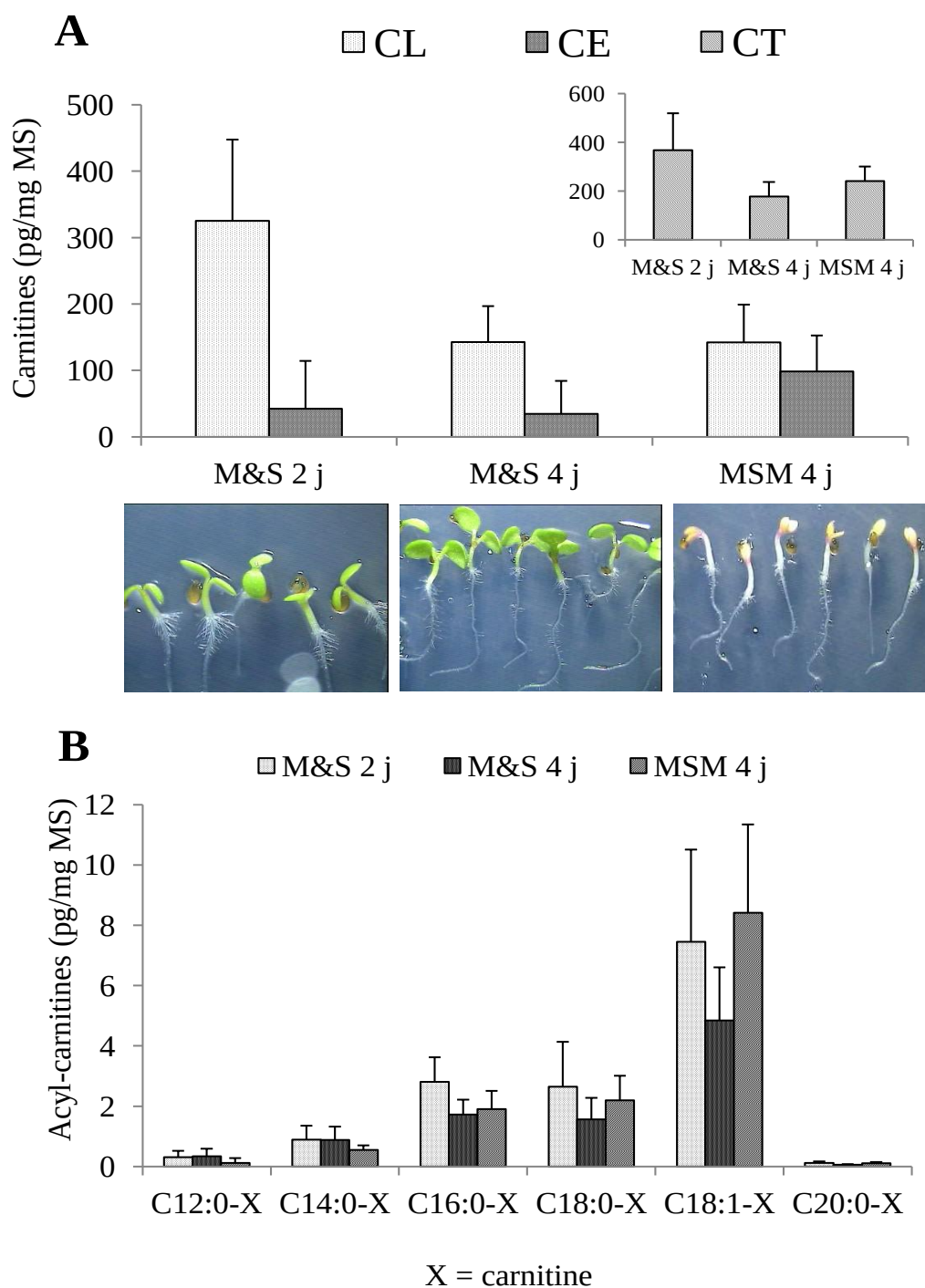


Figure 26 (A) Teneur totale en carnitine (CT, encart de la figure) et des fractions de carnitine libre (CL) et estérifiée (CE) de plantules d'Arabidopsis (écotype WS) à 2 j ou 4 j de développement post-imbibition sur milieu M&S ou MSM, et photos de plantules représentatives de chaque catégorie. **(B)** Teneur spécifique de chaque acyl-carnitine dosée

dans les différentes catégories de plantules. Les valeurs sont exprimées en pg/mg de matière sèche et représentent la moyenne $\pm$ écart-type des résultats de trois expérimentations biologiquement indépendantes.

Les plantules cultivées sur milieu MSM montrent un retard de développement (Figure 26A). Les plantules de 4 j sont à un stade de développement comparable aux plantules de 2 j cultivées sur milieu M&S. De plus, les cotylédons présentent un développement réduit, ne verdissent pas et montrent une pigmentation violette à la base des cotylédons. La comparaison des teneurs en carnitines a donc été effectuée entre des plantules de 4 j sur milieu MSM et des plantules de 4 j sur milieu M&S (témoin chronologique) ou des plantules de 2 j sur milieu M&S (témoin développemental). A 4 j de développement, les plantules sur milieu MSM présentent des teneurs identiques en carnitines libre et estérifiée aux plantules sur M&S (Figure 26A). De la même manière, les teneurs en acyl-carnitines, cumulées ou non, ne sont pas différentes entre les deux lots de plantules de 4 j (Figure 26B). La comparaison des plantules de 2 j sur M&S et de 4 j sur MSM, sur la base de stades similaires de développement, révèle une teneur plus faible en carnitine libre pour les plantules dont le catabolisme des TAG est inactif et à l'inverse, une teneur plus élevée en carnitine estérifiée (Figure 26A). Les différences manquent toutefois de significativité statistique du fait de la variabilité élevée entre les 3 répétitions biologiques, et il s'agit donc plutôt d'une tendance. Les acyl-carnitines sont aux mêmes teneurs entre les deux catégories de plantules (Figure 26B).

Discussion :

La diminution de l'apport en azote dans le milieu MSM affecte la mobilisation des réserves et par la même, le développement de la plante et l'acquisition de la photo-autotrophie (Martin *et al.*, 2002). Dans nos conditions expérimentales, le développement des plantules s'arrête après l'émergence des cotylédons dont la pigmentation violette caractéristique est liée à l'accumulation d'anthocyanes par une surexpression de la chalcone synthase en réponse au stress (Martin *et al.*, 2002). Le laboratoire avait pu vérifier antérieurement, par analyse lipidique, un ralentissement très significatif de la dégradation des TAG pour des plantules cultivées sur milieu MSM (Thèse B. Bourdin, 2007). Ce ralentissement avait été corroboré par le maintien de l'expression des gènes marqueurs du catabolisme des TAG dans les plantules sur milieu MSM, au-delà des stades de développement où ces gènes ne s'expriment

plus pour des plantules sur milieu M&S. Une différence dans la teneur des diverses fractions de carnitine (libre, estérifiée et acyl-carnitine) était donc attendue en réponse à l'altération du processus de mobilisation des TAG, dans l'hypothèse d'une intervention de la carnitine. La réduction de la teneur en carnitine libre entre des plantules de 2 j sur milieu M&S en phase active de dégradation des TAG, et des plantules de 4 j sur milieu MSM, qui ne mobilisent pas les TAG, pourrait être un indicateur de l'implication éventuelle de la carnitine dans ce processus lipidique. Cependant, ceci apparaît peu probable au regard des résultats concernant la fraction estérifiée et les acyl-carnitines, qui ne présentent pas de différence.

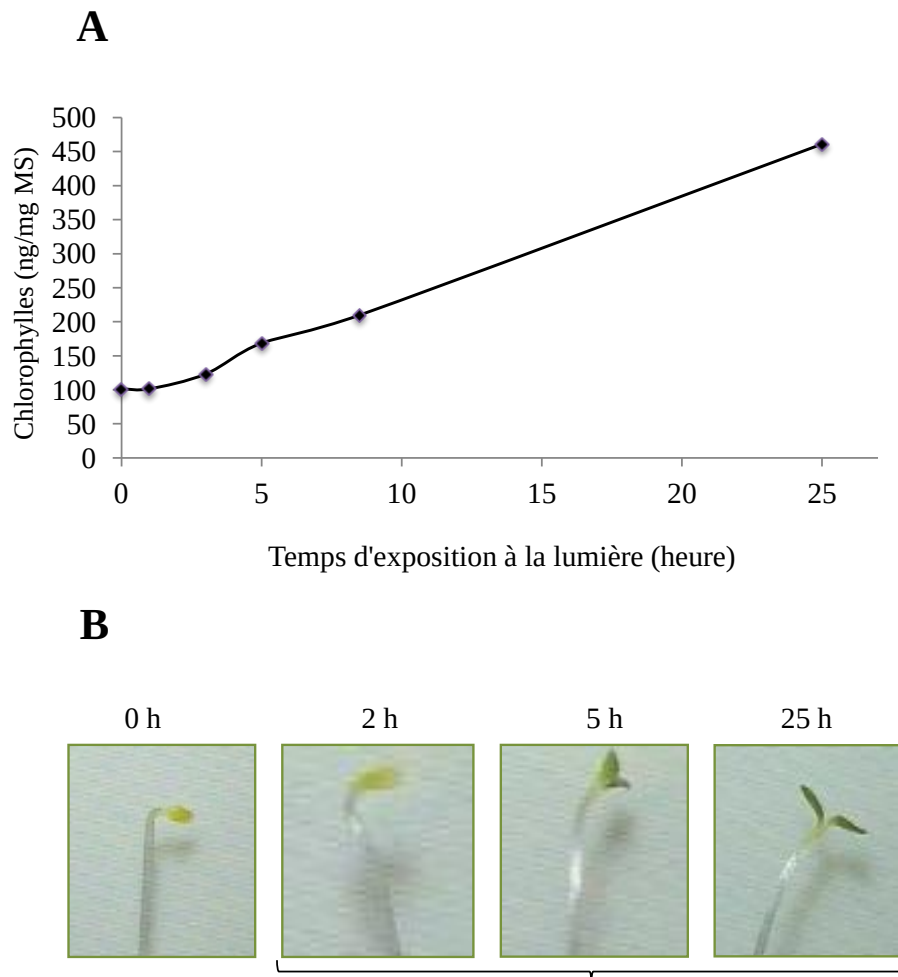
2.4. Processus de dé-étiolement

Pour étudier l'éventuelle implication de la carnitine dans la mise en place de l'appareil photosynthétique, et notamment dans les synthèses lipidiques requises pour l'élaboration des membranes plastidiales, nous avons réalisé une expérience d'étiolement et de dé-étiolement de plantules d'*Arabidopsis*. Il est à noter que le processus d'étiolement est un phénomène observable dans la nature lorsque le tissu ou la plante est soumis à un développement à l'obscurité ou exposé à une très faible intensité lumineuse (Solymosi & Schoefs, 2010). Par exemple, lorsque les graines sont enfouies dans le sol, lors de la post-germination, elles peuvent subir un étiolement et présenter une croissance en longueur de l'hypocotyle (pour une germination épigée) pour émerger les deux cotylédons du sol.

Plus particulièrement, lors d'un développement à l'obscurité (étiolement), les (pro)plastides composant les cellules de l'embryon ne sont pas convertis en chloroplastes, mais en étioplastes qui sont caractérisés par l'absence de chlorophylles, par la présence d'une structure paracristalline ou corps prolamellaire (PLB) constitué majoritairement de glycoglycérolipides (Bahl *et al.*, 1976) et de protochlorophyllides (Pchlides : précurseurs des chlorophylles) complexées aux protéines de type NADPH : Pchlides oxidoreductase (Sperling *et al.*, 1998). Lors de l'exposition à la lumière ou dé-étiolement, un programme de différenciation est activé au sein de la plantule. Les PLB qui sont une réserve de lipides, protéines et pigments contribuent à la formation des membranes des thylakoides et à la conversion des étioplastes en (étio-)chloroplastes (Solymosi & Schoefs, 2010).

2.4.1. Dosage des chlorophylles

Les plantules d'*Arabidopsis* ont été développées à l'obscurité pendant les 2 premiers jours de développement sur milieu M&S, puis exposées à la lumière (dé-étiolement). Nous avons suivi la cinétique d'accumulation de la chlorophylle dans des plantules entières par mesure spectrophotométrique, comme indicateur du verdissement des plantules en cours de dé-étiolement (Figure 27A). Au cours du développement à l'obscurité, les plantules étiolées développent un hypocotyle anormalement allongé et leurs cotylédons sont jaunes du fait de l'absence de chlorophylles qui masquent la présence de pigments caroténoïdes (Solymosi &



Plantule étiolée Plantules en dé-étiolement

Schoefs, 2010 ; Figure 27B). Les dosages montrent que dès la première heure d'exposition à la lumière, les plantules commencent à synthétiser de la chlorophylle (Figure 27A). Cette synthèse apparaît très active pendant les 5 premières heures d'exposition à la lumière et malgré un infléchissement de la courbe d'accumulation après 5 h, la teneur en chlorophylle poursuit son accroissement au moins jusqu'à la 25^{ème} heure.

Figure 27 (A) Evolution de la teneur totale en chlorophylles (chl_a + chl_b) en fonction du temps d'exposition à la lumière (150 μmol de photons.m⁻².s⁻¹) dans des plantules d'*Arabidopsis* (écotype WS) de 2 j post-imbibition, cultivées à l'obscurité sur milieu M&S (plantules étiolées) puis exposées à la lumière (plantules en dé-étiolement). Les valeurs sont exprimées en ng/mg de matière sèche et sont issues d'une seule expérimentation ; **(B)** photos de plantules représentatives montrant le verdissement des cotylédons au cours du temps d'exposition à la lumière.

2.4.2. Dosage des carnitines

Compte tenu des données précédentes, les analyses des différentes fractions de carnitine ont porté sur des plantules en cours de dé-étiolement, transférées à la lumière depuis 6 h, après 2 j de développement à l'obscurité, en comparaison de plantules maintenues à l'obscurité pendant le même temps et représentant le lot témoin.

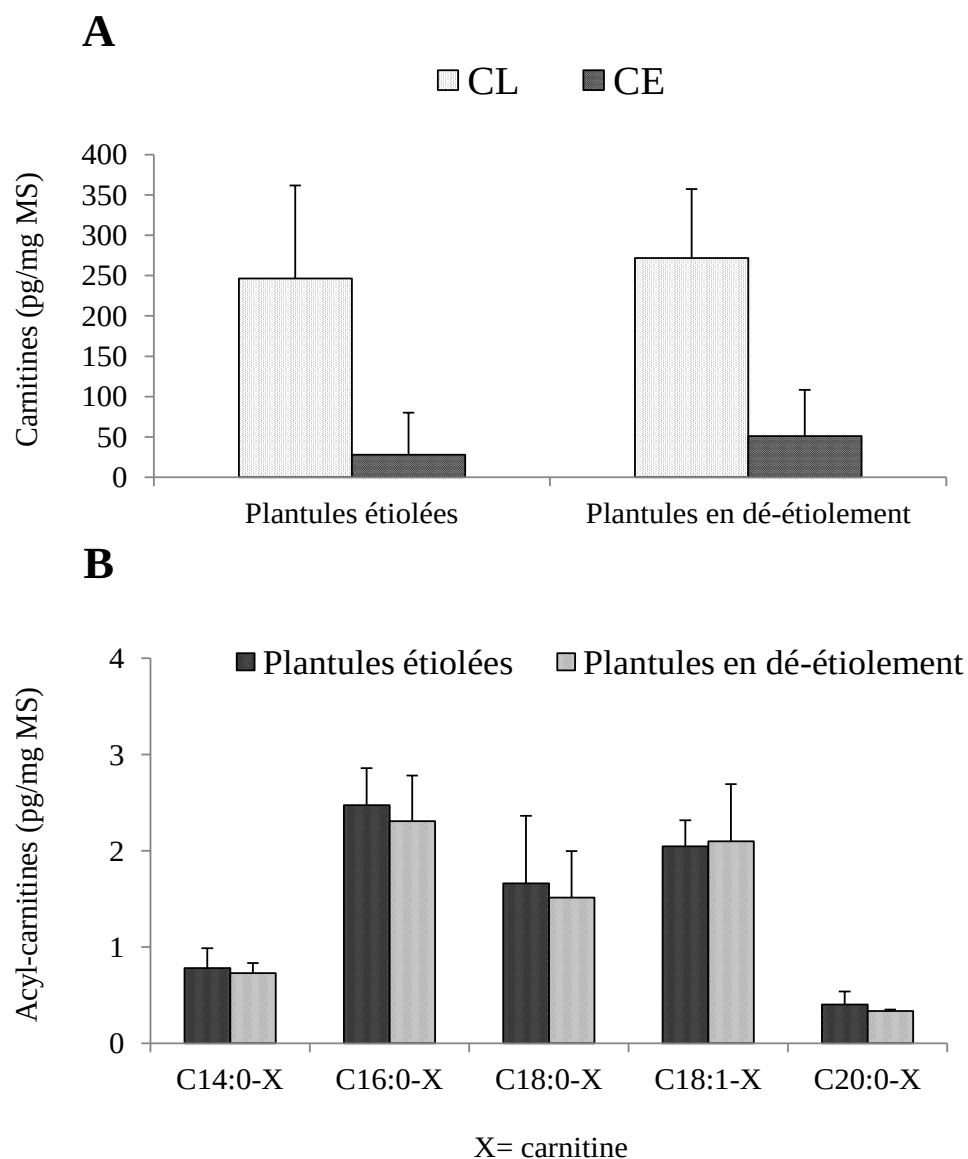


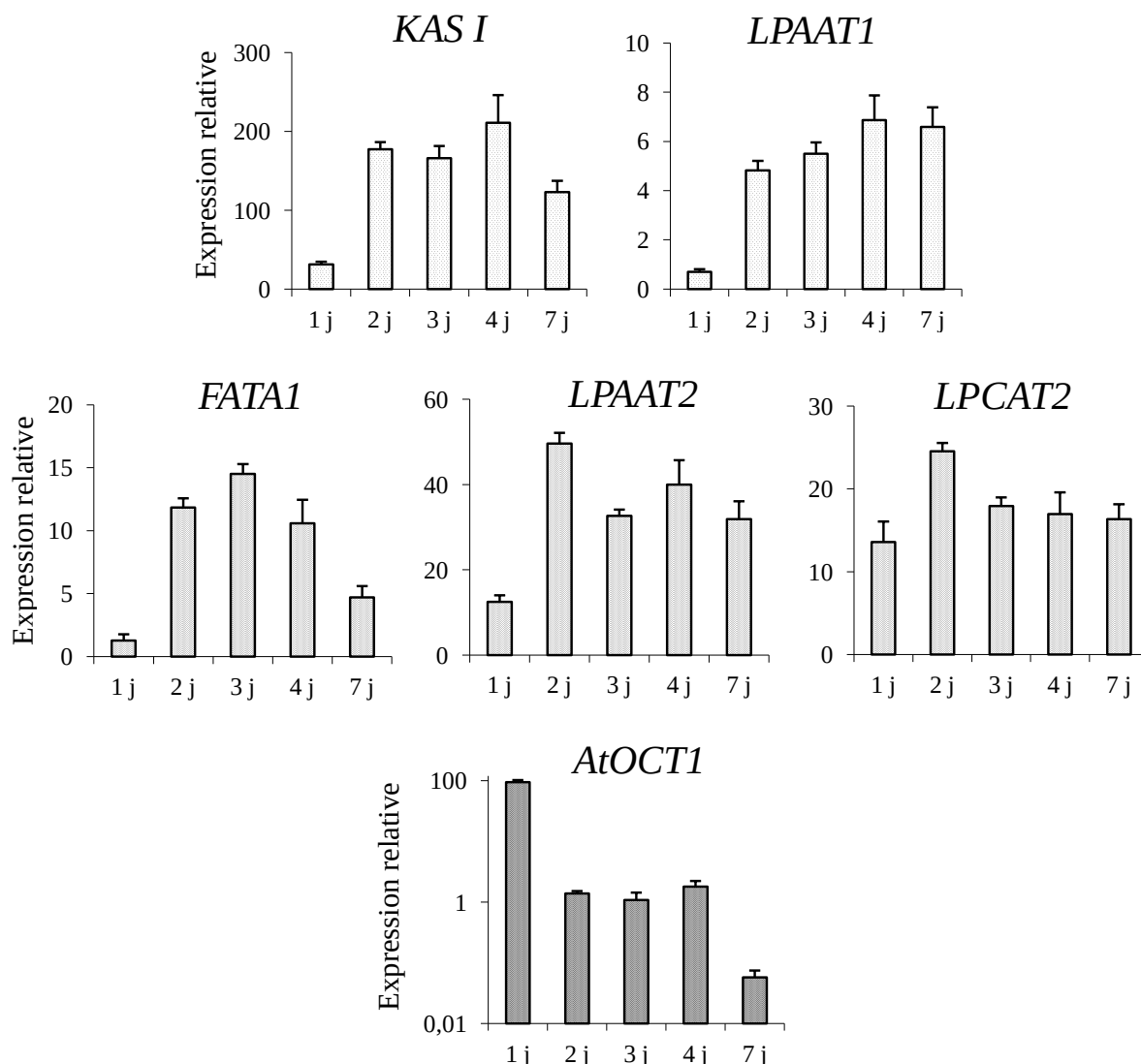
Figure 28 (A) Teneur totale en carnitine libre (CL) et en carnitine estérifiée (CE) dans des plantules d'*Arabidopsis* (écotype WS) de 2 j post-imbibition, cultivées à l'obscurité sur milieu M&S (plantules étiolées) puis exposées à la lumière depuis 6 h (plantules en dé-étiolement). **(B)** Teneur spécifique de chaque acyl-carnitine dosée dans les deux catégories de plantules. Les valeurs sont exprimées en pg/mg de matière sèche et représentent la moyenne $\pm$ écart-type des résultats de trois expérimentations biologiquement indépendantes.

L'analyse des données (Figure 28A et B), montrent que les teneurs en carnitine libre, carnitine estérifiée et acyl-carnitines sont identiques entre plantules étiolées (hétérotrophe) et dé-étiolées (en cours d'acquisition de la photo-autotrophie).

Discussion :

La présence d'acyl-carnitines dans les plantules étiolées d'*Arabidopsis* corrobore les activités carnitine transférase mesurées dans des plantules étiolées d'orge ou de pois (Thomas *et al.*, 1983 ; Swabedissen-Gerbling & Gerhardt, 1995). L'absence de modulation des teneurs en acyl-carnitines au cours du dé-étiolement suggèrent que la carnitine n'est pas impliquée spécifiquement dans la mise en place de la photo-autotrophie et dans la différenciation des plastes/étioplastes en chloroplastes, et que la présence d'acyl-carnitines est indépendante de la lumière. Cependant, en parallèle avec le suivi d'accumulation des chlorophylles, la mesure d'activité de la RUBISCO (enzyme représentative de la photosynthèse) ou de son expression aurait été un bon indicateur de dé-différenciation des étioplastes en chloroplastes photo-autotrophes. En effet, l'accumulation de chlorophylle par conversion de la protochlorophyllide ne prouve pas qu'on a une dé-différenciation directe des étioplastes en chloroplastes et notamment des PLB en thylakoïdes photoactifs dans les plantules en cours de dé-étiolement. De plus, pour mieux évaluer la contribution des acyl-carnitines dans l'établissement de la photo-autotrophie, l'analyse aurait dû porter plus précisément sur les cotylédons et non sur la plantule entière.

2.5. Expression de gènes de la synthèse lipidique au cours du développement post-germinatif



L'analyse du profil en acyl-carnitines au cours de la post-germination des plantules montre que l'oléoyl-, la palmitoyl- et la stéaroyl-carnitine sont majoritaires. Ces acyl-carnitines coïncident avec les AG qui sont exportés des plastes sous forme activée, pour alimenter la voie eucaryotique de la synthèse lipidique. Elles pourraient donc représenter notamment une forme d'exportation de l'oléate, du palmitate et du stéarate générés dans le plaste. Afin d'examiner la possibilité d'une relation entre la recrudescence des acyl-carnitines et la mise en place des voies procaryotique et eucaryotique des synthèses lipidiques au cours du développement post-germinatif, nous avons comparé l'évolution de l'expression de gènes marqueurs à l'évolution des teneurs en carnitines (libre, estérifiée et acyl-carnitines) précédemment mesurée.

Figure 29 Evolution de l'expression de gènes marqueurs des synthèses lipidiques au cours du développement post-germinatif de plantules d'*Arabidopsis* (écotype WS) cultivées *in vitro* sur milieu M&S, entre 1 j et 7 j de développement post-imbibition. La quantification de l'expression a été réalisée par PCR quantitative en temps réel et les valeurs sont relatives à l'expression du gène de référence At4g33380. Abréviations : **KAS I**, gène de la ketoacyl-ACP synthase I ; **FATA1**, gène de l'acyl-ACP thioesterase A isoforme 1 ; **LPAAT1** et **LPAAT2**, gènes des lysophosphatidic acid acyl-transférases 1 et 2 respectivement ; **LPCAT2**, gène de la lysophosphatidylcholine acyl-transférase 2 ; **AtOCT1**, gène de l'organic cation transporter 1.

Le gène *KASI* qui code pour la ketoacyl-ACP synthase I est choisi comme marqueur de la synthèse *de novo* d'AG dans les plastes. *LPAAT1*, codant pour la lysophosphatidic acid acyl-transférase plastidiale, représente la voie procaryotique de synthèse des lipides. *FATA1* codant pour l'acyl-ACP thioesterase qui libère l'oléate de l'ACP avant son exportation vers le cytosol, est un des marqueurs de la voie eucaryotique. Il en est de même pour *LPAAT2* et *LPCAT2* codant respectivement pour la lysophosphatidic acid acyl-transférase cytosolique et la lysophosphatidylcholine acyl-transférase 2. *AtOCT1* représente pour nous, non seulement un gène contrôle non associé au métabolisme lipidique, mais aussi un élément supplémentaire d'étude de la carnitine dans le contexte de la post-germination. En effet, il code pour un transporteur plasmalemmique de cations organiques, *AtOCT1*, qui a été impliqué chez *Arabidopsis* dans le transport de la carnitine.

A l'exception d'*AtOCT1*, les gènes analysés sont peu exprimés à 1 j de développement en comparaison des stades ultérieurs. Deux expérimentations biologiquement indépendantes (Figure 29 et Annexe 2) montrent un accroissement significatif de l'expression de *KASI* entre 1 et 2 j de développement, de manière concomitante à tous les autres gènes marqueurs des synthèses lipidiques. Au-delà de 2 j de développement, les gènes se différencient par des profils d'expression différents. L'expression de *LPAAT2* et *LPCAT2* diminue entre 2 et 3 j et ne varie plus ensuite, contrairement à *FATA1* dont l'expression se maintient entre 2 et 3 j puis diminue aux stades suivants. Les profils d'expression de *KASI* et de *LPAAT1* apparaissent similaires avec une stabilisation de l'expression à partir de 2 j de développement. L'expression d'*AtOCT1* suit une évolution inverse à celle autres gènes testés, avec une première baisse significative entre 1 et 2 j et une seconde après 4 j de développement.

Discussion :

La faible expression des gènes étudiés, à l'exception d'*AtOCT1*, dans les plantules à 1 j de développement suggère une faible activité des synthèses lipidiques en début de la phase post-germinative au moment où le développement est initié par un allongement de l'hypocotyle. L'augmentation significative de l'expression des gènes impliqués dans l'anabolisme lipidique entre 1 et 2 j situe clairement la mise en route des synthèses lipidiques pendant la phase d'allongement de l'hypocotyle et d'émergence des cotylédons. Ceci est à relier au processus de développement qui implique l'élaboration de membranes cellulaires et subcellulaires. L'implication de *KASI* montre qu'une synthèse *de novo* d'AG a lieu dans les plastides, les AG utilisés dans les synthèses lipidiques ne provenant donc pas de l'hydrolyse des TAG de réserve. Les données font aussi apparaître la coexistence des voies procaryotique et eucaryotique à tous les stades étudiés. Cependant, la comparaison des données obtenues entre *LPAAT1*, *LPAAT2* et *LPCAT2* semble indiquer qu'à un stade tardif du développement post-germinatif (4 j) et au-delà (7 j), la voie procaryotique (mesurée par l'expression de *LPAAT1*) s'intensifie par rapport aux stades plus précoces alors que la voie eucaryotique (mesurée par l'expression de *LPAAT2/LPCAT2*) présenterait un pic d'activité à 2 j de développement.

D'après nos données antérieures (Thèse B. Bourdin, 2007) portant sur les marqueurs de la photosynthèse (cf. §2.2.2. p 88), les plantules à 2 j de développement initient leur processus d'acquisition de la photo-autotrophie. La recrudescence du métabolisme lipidique à ce stade est donc certainement destinée à l'élaboration des membranes cellulaires et subcellulaires pour la multiplication cellulaire, mais aussi des membranes plastidiales et thylacoïdiennes pour la maturation des proplastides en chloroplastes (Benning, 2009). Les membranes plastidiales sont constituées de glycérolipides synthétisés pour partie dans le plaste par la voie procaryotique et pour partie au niveau du RE par la voie eucaryotique (Benning, 2009 ; Bates *et al.*, 2012). Ceci explique la coexistence des 2 voies à tous les stades de développement des plantules. Le profil d'expression obtenu pour *LPAAT2* et *LPCAT2*, marqueurs de la voie eucaryotique de la synthèse lipidique, est similaire au profil d'évolution des teneurs en acyl-carnitines avec un pic à 2 j de développement. Cela n'est pas le cas concernant le gène *LPAAT1* qui caractérise la voie procaryotique. Ceci peut être considéré comme un élément étayant l'hypothèse d'une intervention de la carnitine dans la voie eucaryotique de la synthèse des lipides. Il faut noter par ailleurs que l'expression de *FATA1* semble suivre une évolution comparable à celle des teneurs en oléoyl-carnitine (cf. Figure 25B). Cependant, la faible significativité statistique des variations mesurées pour

l'oléoyl-carnitine ne permet pas d'en faire un élément déterminant en faveur de l'intervention de la carnitine dans l'exportation de l'oléate libéré de l'ACP par FATA1. Notons cependant que si le substrat préférentiel de FATA1 est l'oléoyl-ACP, elle présente également une certaine affinité pour la stéaroyl-, la palmitoléoyl- et la palmitoyl-ACP. FATB, dont nous n'avons pas analysé le niveau de transcription présente quant à elle un plus large éventail de substrat, avec une forte affinité pour les acyl-ACP précitées ainsi que pour la myristoyl-ACP (Salas & Ohlrogge, 2002). Ainsi, dans l'hypothèse d'une prise en charge par la carnitine des acyl-CoA suite à l'hydrolyse des acyl-ACP, l'activité combinée de FATA1 et de FATB pourrait expliquer la présence d'acyl-carnitines de longueur de chaînes variables (Salas & Ohlrogge, 2002 ; Bonaventure *et al.*, 2003).

Des mutants perte-de-fonction d'*Arabidopsis* existent présentant une altération de l'activité de la voie eucaryotique. Nous avons pu disposer du mutant *fatb-ko* et avons comparé sa composition en acyl-carnitines à celle de l'écotype sauvage WS correspondant. Les teneurs en AG saturés (C16:0 et C18:0) chez le mutant *fatb-ko* sont largement réduites par rapport à son contrôle sauvage et induisent une diminution des teneurs en C16:0 dans la composition des phosphoglycérolipides d'origine eucaryotique (Bonaventure *et al.*, 2003). Dans l'hypothèse d'une implication de la carnitine dans la prise en charge des acyl-ACP hydrolysées par FATB, nous pourrions nous attendre à une diminution des teneurs en palmitoyl- et stéaroyl-carnitine dans les plantules à 2 j post-imbibition. Pourtant, les résultats de trois expérimentations indépendantes (présentés en Annexe 3) ne permettent pas de déceler d'influence de l'abolition de l'activité de FATB sur la teneur en acyl-carnitines correspondant aux AG que l'enzyme libère. En effet, il apparaît que la diminution dans les teneurs en AG exportés du plaste n'impacte pas sur les teneurs respectives en palmitoyl- et stéaroyl-carnitine mesurées. Ces résultats laissent à penser que si les acyl-carnitines sont d'origine plastidiales, elles n'interviendraient pas dans la synthèse des glycérolipides en générale, mais éventuellement dans la synthèse de lipides en particuliers. Ainsi chez *fatb-ko*, malgré une diminution de près de 50 % en C16:0 dans la composition des phosphoglycérolipides eucaryotiques, des teneurs en cire, les lipides de type sphyngoïde ne sont pas affectés dans leur composition en AG par rapport au contrôle sauvage (Bonaventure *et al.*, 2003). Ces données suggèrent qu'il existerait des mécanismes potentiels dépendant de la carnitine par exemple, qui permettraient de préserver la composition normale en AG de certains lipides tels que les sphingolipides dérivés des sphyngoïdes qui occupent à la fois un rôle structural de

membranes biologiques et seraient impliquées dans différents processus biologiques et environnementaux (Markham *et al.*, 2013). A ce titre, il a été rapporté chez l'animal que les acyl-carnitines peuvent constituer une réserve d'acyles activés alimentant les cycles de déacylation/réacylation des phospholipides des membranes des érythrocytes (Arduini *et al.*, 1992) et intervenant également dans la modification post-traductionnelle de protéines par palmitoylation (Nalecz *et al.*, 2007).

L'expression du gène *AtOCT1* présente une évolution différente des gènes marqueurs du métabolisme lipidique avec une activité transcriptionnelle très intense à 1 j de développement suivie d'une chute très prononcée aux stades ultérieurs, ce qui corrobore les résultats de Lelandais-Brière *et al.* (2007). Les transporteurs *AtOCT2* à *AtOCT6* sont localisés au niveau du tonoplaste et sont différenciellement induits par des stress de type froid, hydrique et salin qui affectent l'homéostasie de la vacuole (Küfner & Koch, 2008). Ainsi, lors de son imbibition l'accumulation rapide d'eau peut induire un stress chez l'embryon. Il est envisageable que *AtOCT1* soit surexprimé pour contribuer à l'homéostasie de solutés osmoprotectant (carnitine, proline...) pour adapter le potentiel hydrique et améliorer la tolérance de l'embryon au stress hydrique induit, à l'instar des autres membres de la famille des *AtOCT* (4, 5 et 6).

2.6. Analyse des esters de carnitine

La découverte d'une fraction de carnitine estérifiée, libérée par traitement de saponification, en large excès par rapport à la fraction des acyl-carnitines analysées suggère une association substantielle de la carnitine à des AG non dosés et/ou à d'autres types d'acides organiques. Nous avons donc initié une étude visant l'identification des esters de carnitine, employant la spectrométrie de masse à temps de vol (qTOF-MS/MS). La qTOF-MS/MS permet une résolution en masse 100 fois plus précise, au millième, que la spectrométrie par triple quadrupole (QQQ-MS/MS). Par contre, le détecteur associé à la qTOF-MS est beaucoup moins sensible que celui de la QQQ-MS. Nous avons donc choisi de travailler sur le colza afin de favoriser la production de biomasse par rapport à *Arabidopsis*. Bien que le colza présente un développement proche de celui d'*Arabidopsis*, nous avons dans un premier temps validé ce modèle d'étude concernant la composition en carnitine, acyl-carnitine et esters de carnitine en fonction des stades de développement post-germinatif, avant d'analyser les esters de carnitine par qTOF-MS sur les extraits appropriés.

2.6.1. Validation du colza en post-germination

Le colza présente une évolution du développement post-germinatif comparable à celle d'*Arabidopsis* mais moins synchrone. A 1 j de développement sur milieu MS la majorité des plantules présente une racicule émergée avec un hypocotyle en élongation et des cotylédons encore recouverts du tégument de la graine (Figure 30A).

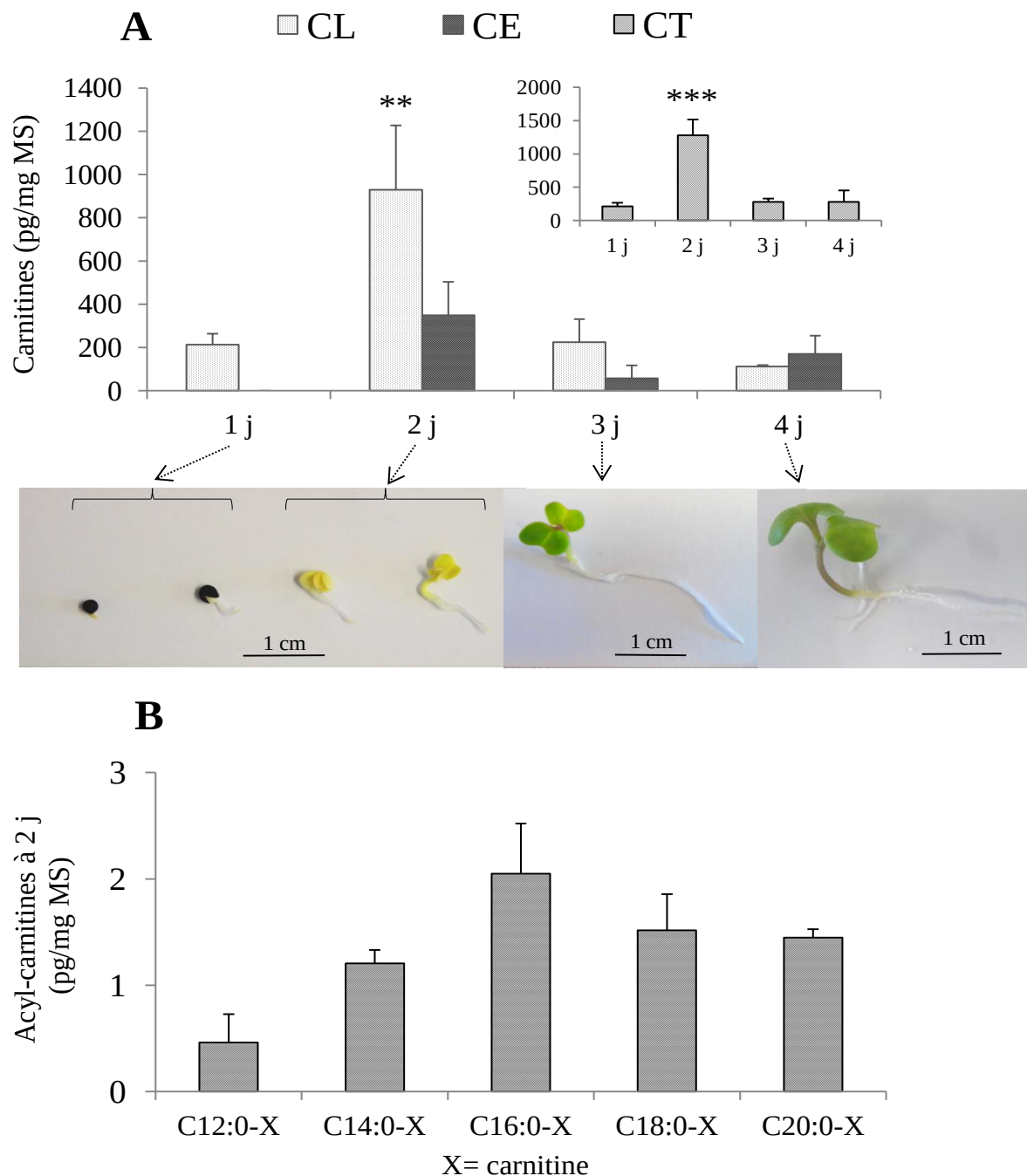


Figure 30 (A) Evolution de la teneur totale en carnitine (CT, encart de la figure) et des fractions de carnitine libre (CL) et estérifiée (CE) au cours du développement post-germinatif de plantules de colza (cv. Westar) cultivées *in vitro* sur milieu M&S, entre 1 j et 4 j de développement post-imbibition (*photos* : plantules représentatives des différents stades développementaux) ; **(B)** Teneur spécifique de chaque acyl-carnitine dosée dans les plantules à 2 j de développement. Les valeurs sont exprimées en pg/mg de matière sèche et représentent la moyenne $\pm$ écart-type des résultats de trois expérimentations biologiquement indépendantes. Une analyse de variance (one-way ANOVA) indique que les valeurs marquées avec un ou plusieurs astérisques sont significativement différentes de celles des autres groupes analysés. Le seuil de significativité est défini par la valeur de P avec * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ et *** = $P < 0,001$.

A 2 j, les cotylédons ont émergé et sont majoritairement non chlorophylliens bien que certains commencent à verdir. Le développement des plantules s'apparente alors aux stades 2 j (cotylédons à peine émergés) ou encore 3 j (cotylédons déployés) observés pour *Arabidopsis*.

Le dosage des fractions libre et estérifiée de la carnitine révèle, comme chez *Arabidopsis*, une augmentation de la teneur totale en carnitine au stade de 2 j qui atteint environ 1 300 pg/mg MS), comparable à la teneur mesurée pour des plantules d'*Arabidopsis* à 2 et 3 j (cf. Figure 24). La prépondérance de la fraction libre par rapport à la fraction estérifiée dans les plantules de colza de 2 j est similaire à celle mesurée dans les plantules d'*Arabidopsis* de 3 j. Par ailleurs, une diminution de la teneur en carnitine totale est mise en évidence entre 2 et 3 j de développement pour le colza, alors qu'une telle diminution est observée entre 3 et 4 j pour *Arabidopsis*. L'analyse de la composition en acyl-carnitines montre les mêmes composés que chez *Arabidopsis*. Ces expérimentations, effectuées avant que nous disposions du standard commercial, n'ont pas porté sur le dosage de l'oléoyl-carnitine. Mais selon toute vraisemblance l'oléoyl-carnitine est aussi présent dans les extraits de plantules de colza, d'autant qu'il a été dosé plus tard dans des extraits embryonnaires (cf. §2.7. p 107). La teneur cumulée en acyl-carnitines pour des plantules de 2 j, excluant l'oléoyl-carnitine non dosée, ne représente que 2 % de la teneur en carnitine estérifiée validant l'utilisation de plantules de colza pour l'identification des esters de carnitine.

2.6.2. Candidats potentiels

Trois analyses ont été effectuées sur des extraits de plantules de 2 jours issues de 3 cultures indépendantes. Pour chaque analyse, 1 g du matériel végétal a été soumis à une extraction par du méthanol/eau (8/2 : v/v), avec ajout du standard interne ¹³C-palmitoyl-carnitine à 50 pg/mg MS, contre 5 pg/mg MS utilisé pour la quantification des acyl-carnitines. Après séchage sous un flux d'azote, les extraits ont été repris dans 100 µL de méthanol/eau (8/2 : v/v), soit un rapport volume d'extrait/masse d'échantillon 10 fois plus élevé que dans le cas de la quantification des carnitines, ceci afin de palier au manque de sensibilité de la qTOF-MS.

L'analyse des extraits par qTOF-MS/MS a révélé la présence de plus de 1 000 composés. Chaque ion parent généré, représentatif de chacun des composés, a été soumis à

une spectrométrie de masse en tandem, la première pour déterminer son rapport m/z et la seconde, après fragmentation, pour déterminer le rapport m/z des ions fils générés. Les composés pouvant correspondre à des esters de carnitine ont été sélectionnés spécifiquement avec un filtre de recherche que nous avons établi selon les critères suivants :

- Le composé (ou ion parent) doit avoir une intensité d'aire de pic supérieure à 70 000.
- La fragmentation de l'ion parent produit un ion fils d'un rapport m/z de $85,029 \pm 10^{-3}$ ($[^+CH_2-CH=CH-COOH]$, issu du réarrangement de McLafferty) et induit une perte de neutre correspondant à une masse de $59,073 \pm 10^{-3}$ ($[HN^+(CH_3)_3]$, fragment triméthylammonium).
- Ce composé doit être retrouvé dans au moins deux des trois répétitions biologiques.

Rapport m/z de l'entité	Masse atomique du candidat potentiel (U)	Formule brute possible de l'ester de carnitine	Masse atomique de l'ester de carnitine (U)	Formule brute possible de l'acide organique associé à la carnitine
328,249	327,241	C ₁₈ H ₃₃ NO ₄	327,241	C ₁₁ H ₂₁ O ₃
404,155	403,149	C ₁₇ H ₂₅ NO ₁₀	403,148	C ₁₀ H ₁₃ O ₉
	403,149	C ₁₈ H ₂₁ N ₅ O ₆	403,149	C ₁₁ H ₉ N ₄ O ₅
506,238	505,231	C ₂₆ H ₃₅ NO ₉	505,231	C ₁₉ H ₂₃ O ₇
	505,231	C ₂₇ H ₃₁ N ₅ O ₅	505,232	C ₂₀ H ₁₉ N ₄ O ₄
560,269	559,263	C ₂₆ H ₄₁ NO ₁₂	559,263	C ₁₉ H ₂₉ NO ₁₁
	559,263	C ₂₁ H ₃₈ N ₉ O ₇ P	559,263	C ₁₄ H ₂₆ N ₈ O ₇ P
	559,263	C ₂₇ H ₃₇ N ₅ O ₈	559,264	C ₂₀ H ₂₅ N ₄ O ₇
617,27	616,263	C ₂₇ H ₄₃ N ₃ O ₁₁ P	616,263	C ₂₀ H ₃₁ N ₂ O ₁₀ P
	616,263	C ₃₁ H ₄₅ N ₃ O ₄ P ₃	616,262	C ₂₄ H ₃₃ N ₂ O ₃ P ₃
	616,263	C ₂₉ H ₄₈ NO ₇ P ₂ S	616,263	C ₂₂ H ₃₆ O ₆ P ₂ S

Tableau 14 Entités sélectionnées par le filtre de recherche adapté aux esters de carnitine. Pour chaque candidat, des exemples de formules brutes potentielles de l'ester de carnitine sont proposées par le logiciel ChemSpider. Par déduction, nous avons déterminé la formule brute de l'acide organique associé à la carnitine (m/z, masse sur charge ; U, unité de masse des atomes unifiée).

Pour exemple, le composé de rapport m/z 560,269 est retenu comme ester de carnitine potentiel car il a été retrouvé dans les 3 extraits analysés, il a présenté une aire de pic d'une valeur supérieure à 70 000 et sa fragmentation a produit un ion fils de rapport m/z de 85,028 et une perte de neutre de masse de 59,074. Notre filtre de recherche nous a ainsi permis de sélectionner 5 candidats potentiels répondant aux critères définis, dont les rapports m/z vont

de 328 à 617 (Tableau 14). L'interface du logiciel ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>) associée à la qTOF-MS/MS a permis d'établir des formules brutes potentielles pour chacune des entités sélectionnées par notre filtre de recherche. Une à 3 des formules les plus probables selon ChemSpider sont présentées dans le Tableau 14. De ces formules nous avons déduit la formule brute possible de l'acide organique associé à la carnitine. D'après cette analyse, les acides organiques potentiels présenteraient une masse atomique allant de 201 à 490 U et seraient composés de 10 à 24 carbones. Certains acides organiques comporteraient de l'azote, du phosphore et/ou du soufre.

Discussion :

Les acyl-carnitines ne sont pas détectées par la qTOF-MS/MS malgré des échantillons concentrés 10 fois par rapport aux analyses effectuées avec la QQQ-MS/MS. Nous avons pu toutefois identifier notre standard interne ^{13}C -palmitoyl-carnitine ajouté à la concentration de 50 pg/mg MS et correspondant à une intensité d'aire de pic de 20 000. Ainsi, cette méthode analytique ne permet pas d'identifier des esters de carnitine qui seraient présents à des teneurs proches de celles des acyl-carnitines *in planta*.

L'analyse par qTOF-MS/MS révèle 5 composés pouvant correspondre à des esters de carnitine d'après le filtre de recherche que nous avons établi. Le logiciel ChemSpider nous a proposé des formules brutes possibles, ainsi qu'un grand nombre de composés potentiels. En parallèle, nous avons effectué une recherche théorique, non exhaustive, montrant que les 5 candidats ne correspondent pas à de la carnitine liée à des hormones dont l'acide abscissique, l'acide jasmonique, les auxines et les gibbérellines, à des acides aminés (méthionine, asparagine, arginine,...) ou encore à des intermédiaires métaboliques impliqués dans le cycle TCA ou le cycle du glyoxylate. Une comparaison relative des aires de pic avec celle du standard interne, suggère que ces entités sont présents dans nos extraits biologiques à des teneurs au moins supérieures à 50 pg/mg MS. Nous notons que les 5 entités retenues sont beaucoup plus concentrées que les acyl-carnitines, qui elles ne sont pas détectées, et pourraient donc représenter une partie du pool de carnitine estérifiée.

Pour vérifier que ces 5 entités représentent effectivement des esters de carnitine, nous avons initié une expérience de supplémentation en carnitine- d_3 lors du développement des plantules de colza. Dans la mesure où la carnitine- d_3 est métabolisée par la plante, les mêmes entités avec un rapport m/z augmenté de 3 devraient être révélées par l'analyse en qTOF-

MS/MS. Un premier essai n'a pas permis d'identifier les composés attendus. Une analyse des extraits par QQQ-MS/MS, selon la méthodologie usuelle, a confirmé l'incorporation de la carnitine-d₃ en très grande quantité dans les plantules mais n'a pas révélé d'acyl-carnitines deutérées. Ceci suggère une faible incorporation de la carnitine-d₃ au niveau du pool d'acyl-carnitines et donc vraisemblablement au niveau du pool d'esters de carnitine.

2.7. Embryogenèse et maturation de la graine

Chez les plantes, l'embryon en développement accumule des réserves carbonées, sous forme de protéines de stockage, d'amidon et/ou de TAG au niveau de l'endosperme ou des cotylédons, qui serviront à alimenter la plantule en précurseurs carbonés et en énergie pendant sa phase de développement hétérotrophe. Chez les plantes oléagineuses, telles qu'*Arabidopsis* et le colza, la majorité des réserves est représentée par des TAG stockés dans les cotylédons. Lors d'une phase dite de remplissage, les AG nouvellement synthétisés sont majoritairement exportés (> 95 %) pour la synthèse des TAG qui emprunte la voie eucaryotique (Ohlrogge & Browse, 1995 ; Bates *et al.*, 2009). L'intervention éventuelle de la carnitine dans le cadre de la synthèse des TAG a donc été analysée par le dosage des différentes fractions (carnitine libre, carnitine estérifiée et acyl-carnitines) lors du remplissage de la graine. L'expérimentation a été menée sur le colza, générant une plus grande biomasse et surtout facilitant l'étiquetage des fleurs pour l'échantillonnage des embryons. Les dosages ont été effectués sur des extraits de graines en développement, prélevées sur des plants cultivés en serre, à des jours précis après la floraison en fonction d'une cinétique d'accumulation des TAG effectuée en parallèle. Ce travail a fait l'objet d'une collaboration avec Mr Sébastien ACKET effectuant une thèse de Doctorat dans le laboratoire portant sur l'étude comparative des métabolismes lipidiques entre des oléagineuses productrices ou non d'AG inhabituels et la modélisation des systèmes.

Les mesures d'accumulation des TAG (selon une méthode adaptée de Bligh & Dyer, 1959) effectuées par S. ACKET, montrent une phase de 15 jours après la floraison pendant laquelle l'embryon produit peu de TAG (Figure 31). La phase de remplissage de la graine démarre à partir du 16^{ème} j et se poursuit pendant 16 j. Au 32^{ème} jour le taux de TAG a atteint son maximum, et la mesure de la matière sèche des 3 lots de graines montre qu'en fin de période de remplissage, l'huile représente 47 % de la matière sèche de la graine dans nos conditions de culture (Figure 31). Ce profil d'évolution des teneurs en TAG est en accord

avec l'étude menée par Turnham & Northcote (1983) sur les embryons de colza, avec un début de remplissage à 16 jours pour finir à 28 jours après floraison, en corrélation avec l'activité de l'acétyl-CoA carboxylase qui est accrue pendant la phase linéaire de remplissage de l'embryon (enzyme catalysant la première étape de synthèse des AG).

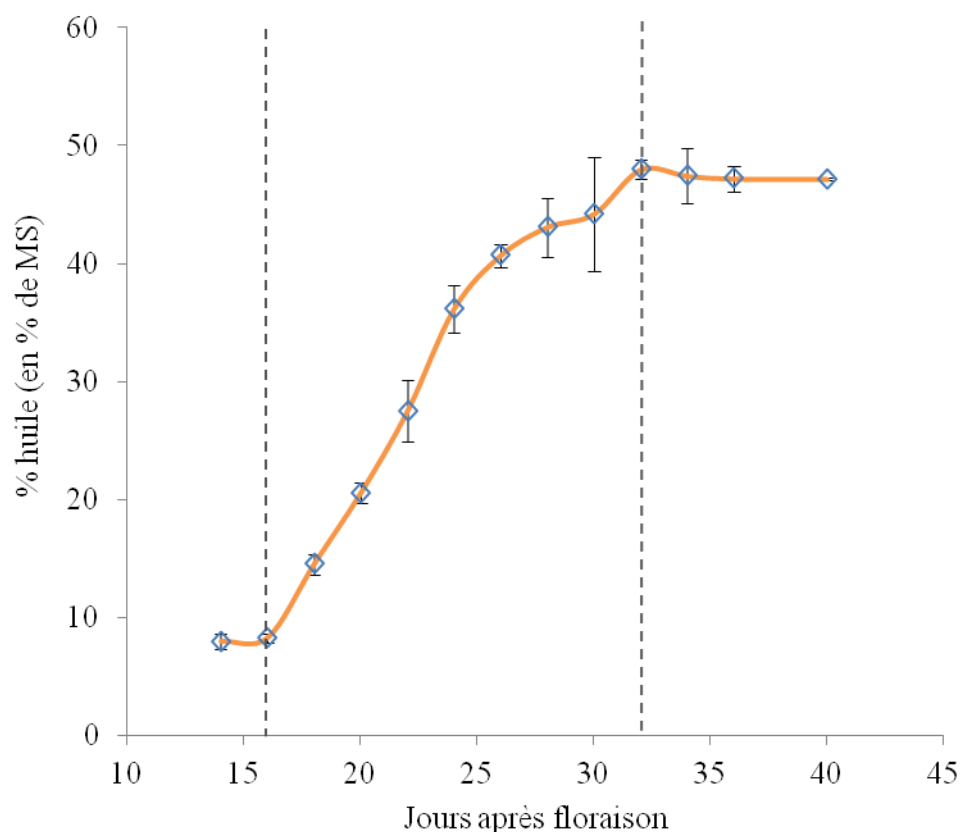


Figure 31 Evolution de la teneur en TAG au cours du développement de la graine de colza (cv. Westar), d'après des données obtenues par Sébastien ACKET. Les valeurs sont exprimées en masse d'huile pour 100 g de matière sèche.

Le dosage des acyl-carnitines a été effectué sur 3 lots de graines prélevées à 14-15, 18-21 et 25-30 jours après floraison, pour couvrir une phase où la synthèse de TAG est minimale, une phase précoce et une phase tardive au cours de la maturation de la graine où la synthèse est très active. La carnitine n'a pas pu être dosée du fait de difficultés à l'extraire ainsi qu'à saponifier les extraits, dans le cadre de ces expérimentations sur les embryons.

Compte tenu de la variation dans la part de l'huile dans la valeur de la matière sèche, les résultats sont exprimés en fonction de la matière sèche globale et en fonction de la matière sèche exemptée de la fraction huile. Les résultats de trois analyses biologiquement indépendantes montrent que la teneur en acyl-carnitines est maximale à 14-15 j (11 pg/mg

MS) puis diminuent progressivement pendant la phase de remplissage de la graine (5 pg/mg MS à 18-21 j et 3 pg/mg MS à 25-30 j (Figure 32).

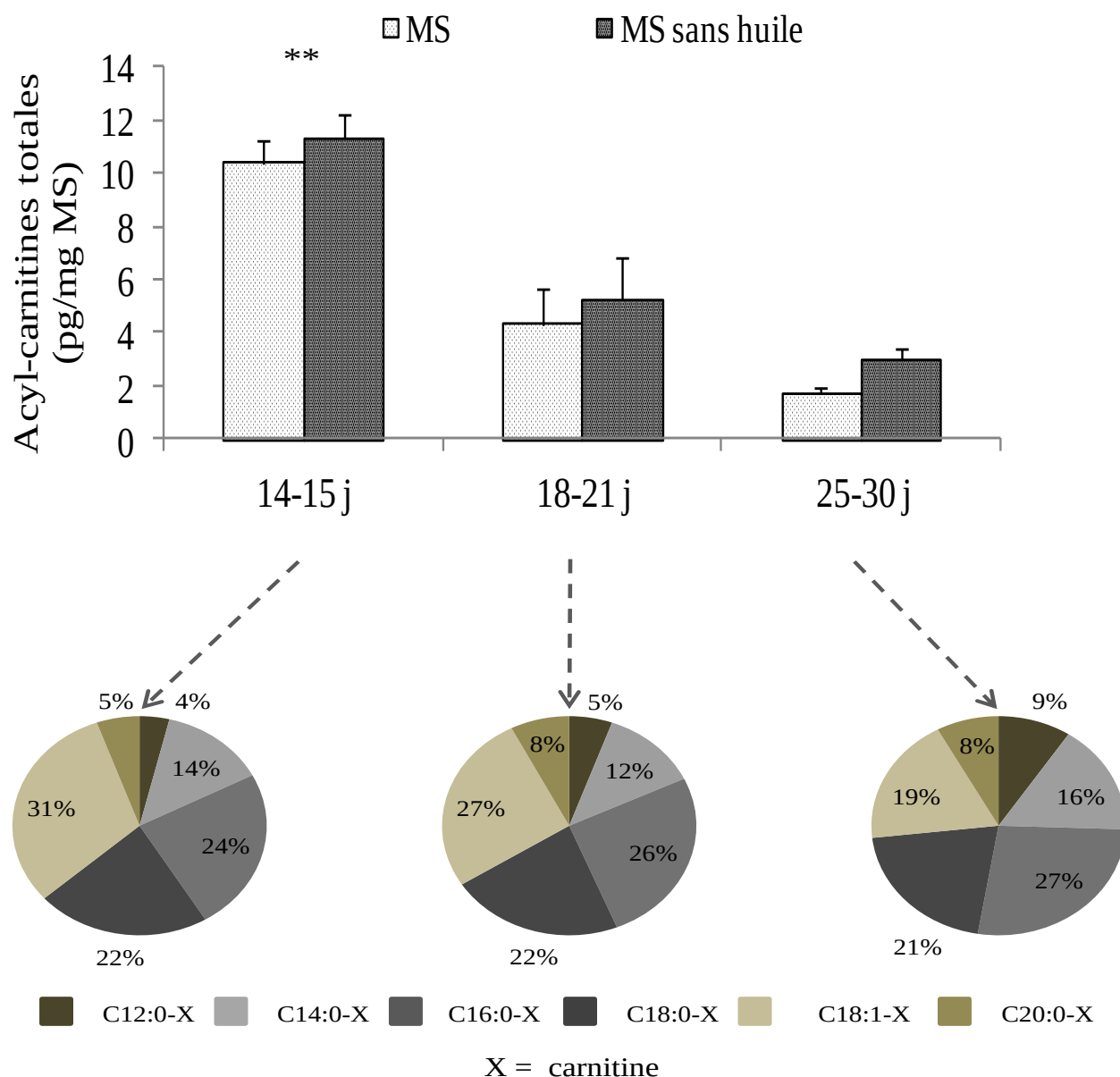


Figure 32 Evolution de la teneur cumulée en acyl-carnitines au cours du développement de la graine de colza (cv. Westar) cultivé en serre, à 14-15, 18-21 et 25-30 jours après floraison, et représentation de la proportionnalité (en % de la teneur cumulée) de chaque acyl-carnitine. Les valeurs sont exprimées en pg/mg de matière sèche, globale (MS) ou exemptée de la masse d'huile (MS sans huile), et représentent la moyenne $\pm$ écart-type des résultats de trois expérimentations biologiquement indépendantes. Une analyse de variance (one-way ANOVA) indique que les valeurs marquées avec un ou plusieurs astérisques sont significativement différentes de celles des autres groupes analysés. Le seuil de significativité est défini par la valeur de P avec * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ et *** = $P < 0,001$.

La composition de la fraction des acyl-carnitines, avec une prépondérance des oléoyl-, palmitoyl-, stéaroyl-carnitines est similaire à celle déterminée pendant la phase post-germinative du colza et d'*Arabidopsis*. La diminution de la teneur en acyl-carnitines au cours du remplissage reflète une diminution de l'ensemble des composantes de cette fraction.

Discussion :

Les résultats de cette analyse établissent clairement que la synthèse des TAG au cours du remplissage de la graine ne s'accompagne pas d'une prépondérance en acyl-carnitines puisqu'il apparaît au contraire que les teneurs en acyl-carnitines sont plus importantes au cours de la formation de l'embryon (14-15 j) que lors de la phase de remplissage (18-21 j). Ainsi, la prépondérance d'acyl-carnitines au cours de la phase 14-15 j, pourrait suggérer également une implication de la carnitine dans la synthèse des lipides membranaires pour alimenter la division et la différenciation cellulaire au cours de l'embryogenèse. Les teneurs en acyl-carnitines à 18-21 j et 25-30 j pendant la phase de remplissage de la graine diminue progressivement alors que l'analyse d'embryons de tournesol en cours de remplissage a montré que la teneur totale en acyl-CoA (majoritairement représentée par le C18:1-, C18:0-, C16:0-, et C18:2-CoA) est accrue pendant la période de synthèse et d'accumulation rapide des TAG (Aznar Moreno *et al.*, 2013). Les résultats suggèrent donc que les acyl-carnitines semblent moins impliquées dans la prise en charge des AG lors de la synthèse des TAG.

2.8. Organogenèse

Afin d'évaluer l'implication de la carnitine dans la prise en charge des AG activés pour la synthèse de lipides membranaires, nous nous sommes intéressés au processus d'organogenèse, en choisissant la formation racinaire comme modèle. En effet, le taux de croissance racinaire est élevé (10 à 50 nm/s) et pour soutenir cette croissance rapide, une synthèse et un trafic important de protéines et de lipides sont nécessaires à l'élaboration des membranes cellulaires (Campanoni & Blatt, 2007; Yazdanbakhsh & Fisahn, 2010). La croissance racinaire s'articule en deux phases successives : multiplication des cellules du point végétatif, puis élongation cellulaire dans la zone subterminale (Petricka *et al.*, 2012). Notre analyse a porté sur un dosage des différentes fractions de la carnitine (libre, estérifiée et acyl-carnitines) sur des racines de plantules à 11 jours de développement *in vitro* d'une part, et sur des racines induites sur des cals indifférenciés par traitement hormonal approprié d'autre part.

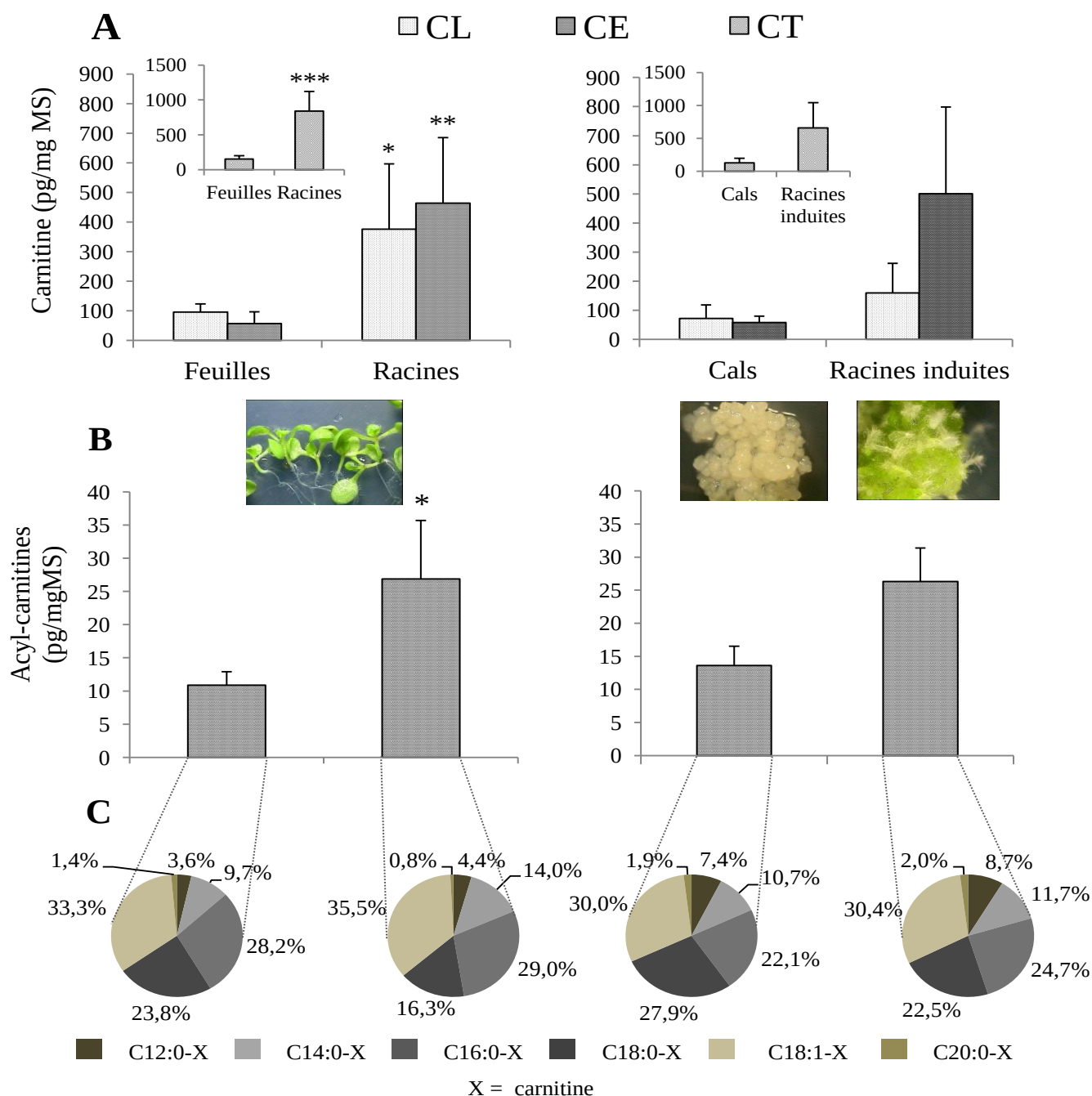


Figure 33 (A) Teneur totale en carnitine (CT, en encart de la figure) et des fractions de carnitine libre (CL) et estérifiée (CE) dans (*partie gauche*) des feuilles et des racines de plantules d'Arabidopsis (écotype WS) à 11 j de développement sur milieu M&S et (*partie droite*) des cals d'Arabidopsis (écotype WS) avant induction racinaire et des racines induites sur les cals. (B) Teneur cumulée des acyl-carnitines dosées dans les différents tissus végétaux. (C) Représentation de la proportionnalité (en % de la teneur cumulée) de chaque acyl-carnitine. Les valeurs sont exprimées en pg/mg de matière sèche et représentent la moyenne $\pm$ écart-type des résultats de cinq expérimentations biologiquement indépendantes pour les feuilles/racines et trois pour les cals/racines induites. Un test de Student (T test) indique que la valeur marquée avec un ou plusieurs astérisques est significativement différente de celle de l'autre groupe analysé. Le seuil de significativité est défini par la valeur de P avec * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$ et *** = $P < 0,001$.

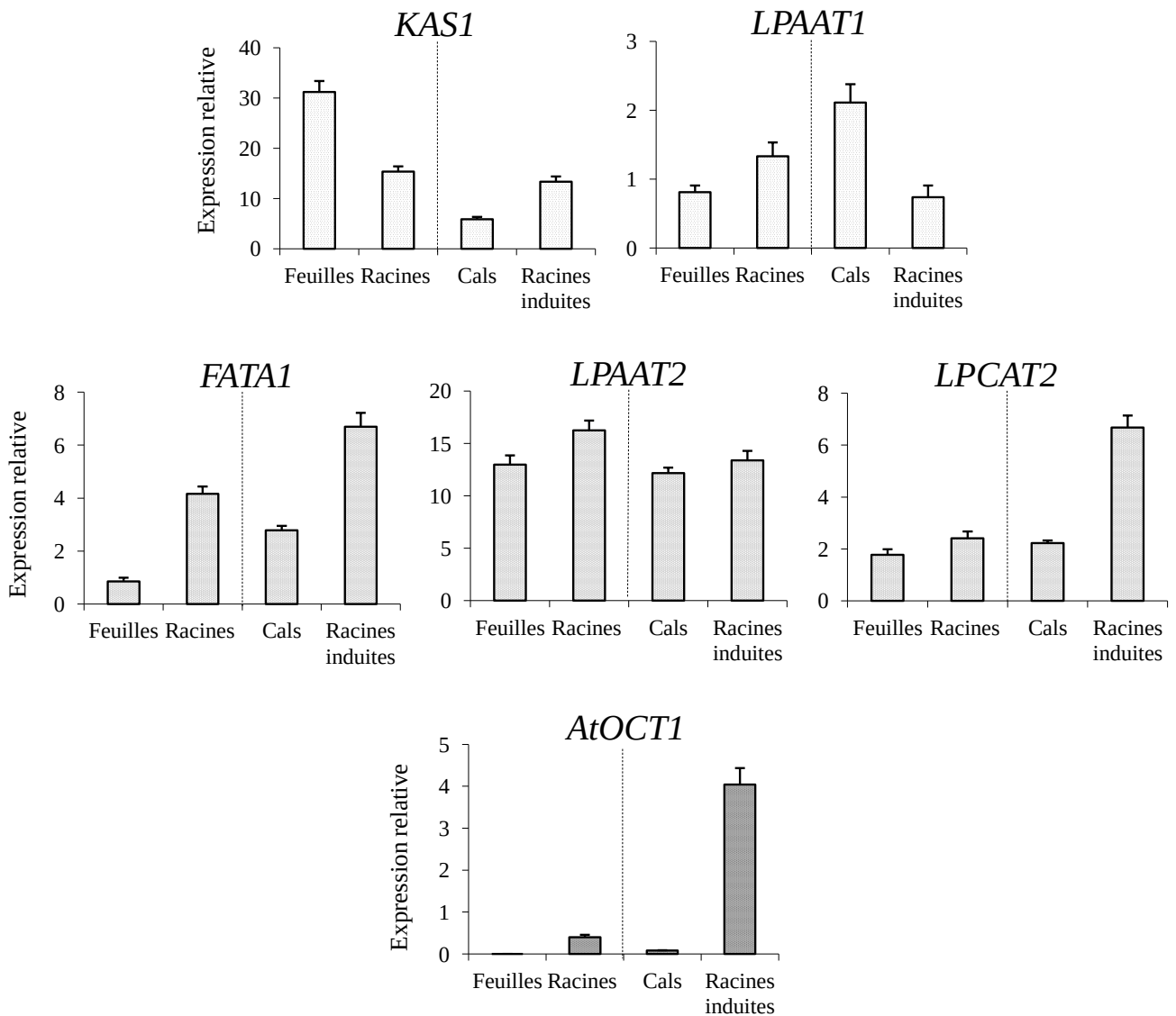


Figure 34 Expression de gènes marqueurs des synthèses lipidiques dans des feuilles et des racines de plantules d'*Arabidopsis* (écotype WS) à 11 j de développement sur milieu M&S et dans des cals d'*Arabidopsis* (écotype WS) avant induction racinaire et des racines induites sur les cals. La quantification de l'expression a été réalisée par PCR quantitative en temps réel et les valeurs sont relatives à l'expression du gène de référence At4g33380. Abréviations : **KAS I**, gène de la ketoacyl-ACP synthase I ; **FATA1**, gène de l'acyl-ACP thioesterase A isoforme 1 ; **LPAAT1** et **LPAAT2**, gènes des lysophosphatidic acid acyltransférases 1 et 2 respectivement ; **LPCAT2**, gène de la lysophosphatidylcholine acyl-transférase 2 ; **AtOCT1**, gène de l'organic cation transporter 1.

Une mesure de l'expression des gènes marqueurs de la synthèse lipidique (Figure 34 et Annexe 4), précédemment étudiés dans le cadre de la post-germination, a été effectuée en parallèle. Les dosages révèlent une augmentation significative de la teneur en carnitine totale dans les racines isolées de plantules ou dans les racines induites (respectivement 830 et 660 pg/mg MS) en comparaison des tissus non racinaires représentés par les feuilles ou les cals (Figure 33A), respectivement 170 et 130 pg/mg MS). Cet accroissement est notamment très marqué concernant la fraction de carnitine estérifiée (environ 500 pg/mg MS). Les acyl-carnitines suivent la même évolution avec une teneur significativement plus élevée dans les racines (environ 26 pg/mg MS) en développement que dans les tissus non racinaires (Figure 33B, entre 10 et 15 pg/mg MS). A nouveau nous notons que les acyl-carnitines ne représentent qu'une faible partie de la fraction estérifiée de la carnitine pour tous les tissus, avec pour exemple une valeur maximale de 2 % dans le cas des racines. Par ailleurs, les acyl-carnitines majoritaires sont encore l'oléoyl-, la palmitoyl- et la stéaroyl-carnitine.

L'analyse par PCR quantitative montre que les gènes *FATA1*, *LPAAT2* et *LPCAT2* sont plus exprimés dans les racines que dans les tissus non racinaires, avec toutefois des différences plus ou moins marquées entre les 2 types de tissus selon que l'on s'adresse à la rhizogenèse de plantules ou à la rhizogenèse de cals (Figure 34). L'évolution de l'expression des gènes *KASI* et *LPAAT1* est inverse selon que la rhizogenèse a lieu sur des plantules ou sur des cals, et une diminution de l'expression de l'un coïncide avec une augmentation de l'expression de l'autre. Enfin, *AtOCT1* qui, pour rappel, représente un gène contrôle non associé au métabolisme lipidique et un élément supplémentaire d'étude de la carnitine, n'est pas exprimé dans les parties non racinaires de plantules alors qu'il l'est dans les racines. L'augmentation de l'expression d'*AtOCT1* dans les racines en développement est notamment très marquée pour la rhizogenèse sur cals.

Discussion :

La hausse de l'expression de *FATA1*, *LPAAT2* et *LPCAT2* dans les racines en développement par rapport aux feuilles ou cals rappelle la hausse des teneurs des différentes fractions de carnitine, et notamment des acyl-carnitines, dans les mêmes tissus. Par contre, aucune analogie entre l'évolution de l'expression des gènes *KASI* et *LPAAT1* et l'évolution des teneurs dans les différentes fractions de carnitine ne peut être établie. Nos résultats montrant une surexpression de *FATA1*, *LPAAT2* et *LPCAT2* dans les racines sont en accord

avec des données de la littérature qui décrivent une implication forte de la voie eucaryotique dans la synthèse des lipides dans les racines, en comparaison des parties aériennes. En effet, les racines contiennent en grande majorité des glycérolipides d'origine eucaryotique (PC, PE, PI+PS) représentant au minimum 86 % des glycérolipides totaux (Li-Beisson *et al.*, 2010). Dans les organes non photosynthétiques, dont les racines, les AG nouvellement synthétisés, majoritairement l'acide oléique et l'acide palmitique, sont ainsi exportés pour 90 % vers la voie eucaryotique contre 60% dans les feuilles (Browse *et al.*, 1986 ; Browse *et al.*, 1993, cités par Schnurr *et al.*, 2002). Le flux et le type d'AG exportés du plaste est déterminé principalement par l'activité des thioesterases FATA et FATB (Salas & Ohlrogge, 2002 ; Bonaventure *et al.*, 2003 ; Moreno-Pérez *et al.*, 2012). Les AG sont ensuite prioritairement incorporés dans un LPC (en *sn*-2) via le processus d'acyl-editing par l'action de la LPCAT2, pour former des PC (Bates *et al.*, 2012). Les C18:1-CoA peuvent être également intégrés dans le LPA (en *sn*-2) via LPAAT2 pour former du PA, précurseurs possibles des lipides eucaryotiques. La concomitance d'une augmentation de l'expression des gènes *FATA1*, *LPAAT2* et *LPCAT2* et d'un accroissement des différentes fractions de carnitine, notamment des acyl-carnitines, va dans le sens d'une implication de la carnitine dans les processus eucaryotiques de la synthèse lipidique. L'évolution de l'expression du gène *LPAAT1* étant au contraire découplée de l'évolution des teneurs en carnitines ceci semble indiquer l'absence d'intervention de la carnitine dans les processus procaryotiques de synthèse lipidique. Ces données rappellent les observations effectuées dans le cadre de l'étude de la post-germination.

Nos résultats indiquent que *LPAAT1* est en moyenne 10 fois moins exprimé que *LPAAT2*. Cette différence d'expression est en accord avec les travaux menés par Kim & Huang (2004) qui ont montré par RT-PCR que *LPAAT2* est ubiquitaire et notamment fortement exprimé dans tous les tissus en croissance, particulièrement dans les racines et un peu moins dans les feuilles de rosette. En revanche, *LPAAT1* est beaucoup moins exprimé dans les tissus que *LPAAT2*, avec malgré tout une faible expression dans les feuilles de rosettes. Cette différence d'expression entre *LPAAT1/LPAAT2* pourrait s'expliquer par le fait que les glycérolipides membranaires, de réserve sont majoritairement synthétisés par la voie eucaryotique qui implique notamment la *LPAAT2*. Néanmoins, si *LPAAT1* est moins exprimé au cours de la vie de la plante, elle occupe malgré tout un rôle important révélé par l'arrêt du développement au stade embryonnaire torpedo du mutant perte-de-fonction *lpaat1* (Kim & Huang, 2004).

D'après nos analyses, *KASI* est 2 fois plus exprimé dans les racines induites que dans les cals. Ceci peut refléter une plus forte activité du métabolisme lipidique, requérant une synthèse accrue d'AG associée à une surexpression concomitante des gènes de thioestérases et acyl-transférases, pour alimenter la croissance de la racine. Dans le cas des plantules en revanche, les tissus foliaires surexpriment *KASI* par rapport aux racines. Ceci pourrait s'expliquer par l'activation de la synthèse d'AG dans les parties aériennes du fait de l'activité photosynthétique. Ainsi, l'exposition à la lumière des graines de colza en maturation et qui sont chlorophylliennes, accroît les teneurs en huile de ces dernières (Ruuska *et al.*, 2004). Par ailleurs, chez le colza la synthèse des AG et l'activité photosynthétique dans les parties chlorophylliennes seraient coordonnés par des facteurs de transcription tels que *WRINCKLED 1* (*WRI1*) (Focks & Benning, 1998 ; Wu *et al.*, 2014). Il a été notamment démontré que l'expression de *BnWRI1* (homologue de *WRI1* chez le colza) est concomitante avec l'expression de gènes marqueurs de la synthèse d'AG et de la photosynthèse durant l'embryogénèse (Wu *et al.*, 2014). De plus, la surexpression de *BnWRI1* permet d'accroître simultanément les teneurs en huile et en chlorophylle dans les graines en maturation.

Nos résultats montrent une induction de l'expression d'*AtOCT1* au cours de l'organogénèse à partir de cals. Ce transporteur présent au niveau du plasmalemme, et notamment dans les tissus vascularisés (Lelandais-Brière *et al.*, 2007), pourrait favoriser le transport et la disponibilité de cations organiques. Ces derniers, dont la carnitine libre qui est prépondérante dans les racines, pourraient être destinés au maintien d'un potentiel hydrique racinaire adéquat avec l'absorption d'eau du milieu externe. Nous avons d'ailleurs démontré que la carnitine, au même titre que la glycine bêtaïne et la proline, peut intervenir comme osmolyte chez *Arabidopsis* (Charrier *et al.*, 2012). Il est aussi envisageable que *AtOCT1* puisse contribuer à alimenter en carnitine des zones en croissance rapide de la racine pour contribuer au métabolisme lipidique impliqué dans l'élaboration des membranes cellulaires.

Enfin, notons que l'augmentation de la fraction de carnitine estérifiée coïncide avec une augmentation des teneurs totales en acyl-carnitines, mais là encore, il est observé que les acyl-carnitines ne représentent qu'une faible partie de la fraction de carnitine estérifiée.

3. EVOLUTION DES TENEURS EN CARNITINES AU COURS DU DEVELOPPEMENT AFFECTE

La plante présente une formidable plasticité phénotypique lui permettant de s'accommoder aux variations de conditions environnementales. Notamment, une carence en phosphate ou une exposition prolongée au froid vont perturber le développement normal de la plante et moduler, entre autres, le métabolisme lipidique pour une adaptation aux stress induits (cf. §2.5.2, p 30). Nos résultats révèlent un lien entre le métabolisme de la carnitine et le métabolisme lipidique des plantes au cours de processus développementaux normaux, et nous avons voulu approfondir notre étude en analysant l'intervention de la carnitine dans des mécanismes d'ajustement lipidique répondant à des perturbations physiologiques.

3.1. Carence en phosphate

La carence nutritionnelle en phosphate chez les végétaux induit des changements lipidiques afin de rendre disponible le phosphate mobilisé sur les phospholipides pour les processus de phosphorylations, et notamment pour la synthèse d'ATP. Ainsi, les phosphoglycérolipides des membranes sont remplacés par des glycérolipides non phosphorylés de propriétés équivalentes (Nakamura *et al.*, 2013).

Nous avons voulu évaluer l'intervention éventuelle de la carnitine dans ce réajustement lipidique, d'autant que des données de transcriptomique ont montré que le gène *AtOCT1* est surexprimé chez *Arabidopsis* en condition de carence en phosphate (Woo *et al.*, 2012), alors même que *AtOCT1* pourrait être impliqué dans le transport plasmalemmique de la carnitine (Lelandais-Brière *et al.*, 2007). Nous avons donc intégré à notre étude le mutant *oct-1-1* au côté du génotype sauvage WS et les 2 génotypes ont été soumis à un milieu appauvri en phosphate. Nous avons comparé leur réponse développementale respective, notamment au niveau racinaire, et leurs compositions dans les différentes fractions de carnitine (libre, estérifiée et acyl-carnitines). Notre attention s'est portée sur l'adaptation racinaire car, d'une part, la carence en phosphate provoque une modification de l'architecture racinaire avec une densification des racines latérales, et que d'autre part, le mutant *oct1-1* présente ce même phénotype racinaire (Lelandais-Brière *et al.*, 2007).

Le milieu appauvri en phosphate est une adaptation du milieu M&S avec une teneur en phosphate réduite au millième (1 μM KH_2PO_4) par rapport au milieu M&S normal (1000 μM

KH_2PO_4) d'après López-Bucio *et al.* (2002). Le mutant *oct1-1* et le témoin sauvage WS ont été développés sur milieu M&S pendant 3 jours avant d'être transférés sur milieu appauvri (-Pi) ou normal (+Pi).

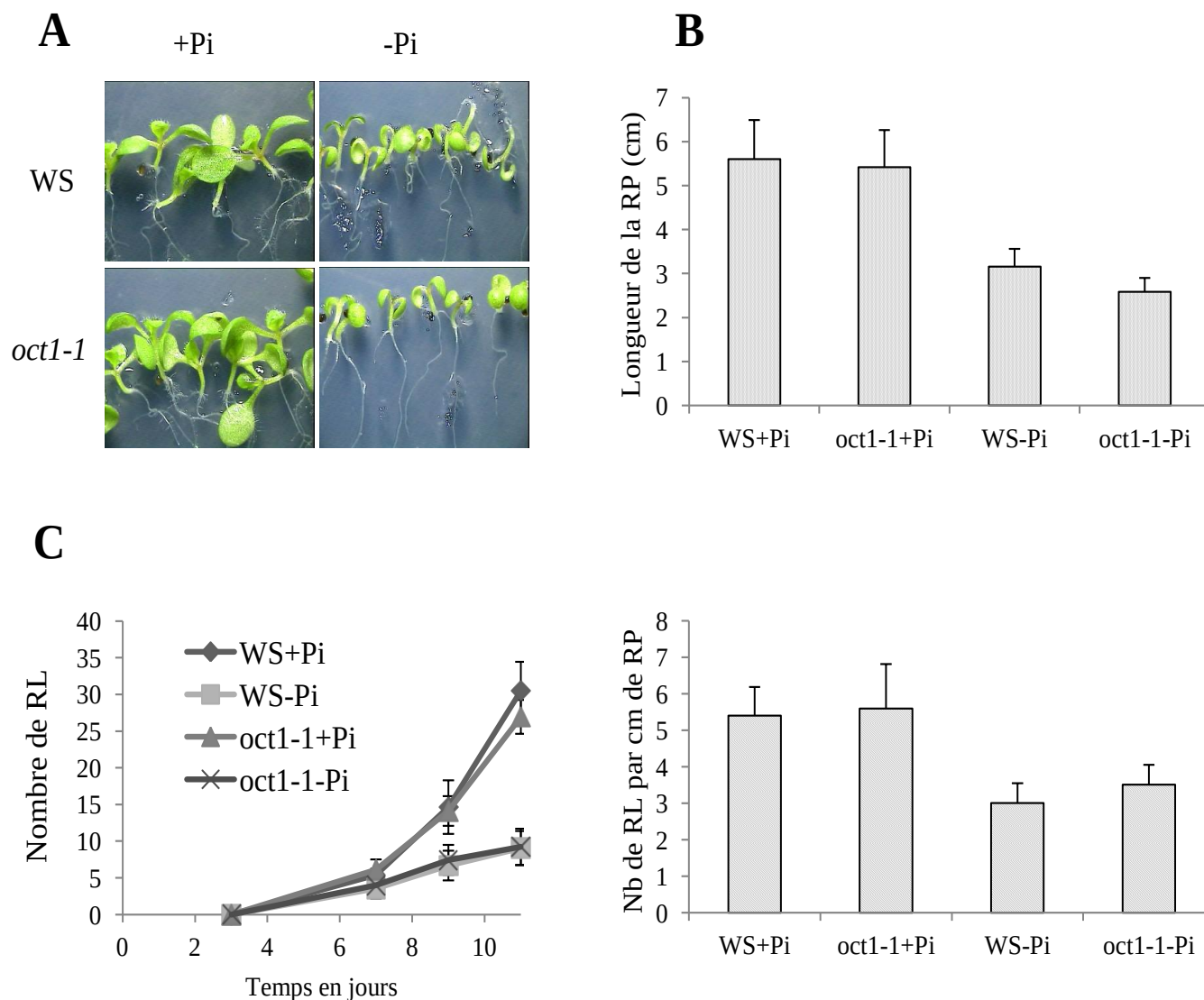


Figure 35 (A) Photos de plantules WS et *oct1-1* à 7 j de développement post-imbibition, 4 j après leur transfert sur milieu M&S $\pm$ Pi; (B) Influence des milieux M&S $\pm$ Pi sur la longueur de la racine principale (RP) exprimée en cm, de plantules WS et *oct1-1* à 11 j de développement post-imbibition, 8 j après leur transfert sur les 2 types de milieu. (C) Evolution du nombre de racines latérales (RL) au cours du temps après le transfert des plantules WS et *oct1-1* sur milieux M&S $\pm$ Pi, et influence des milieux sur la densité des racines latérales exprimée par le nombre de racines latérales par cm de racine principale. Les valeurs représentent la moyenne $\pm$ écart-type des résultats de trois expérimentations biologiquement indépendantes.

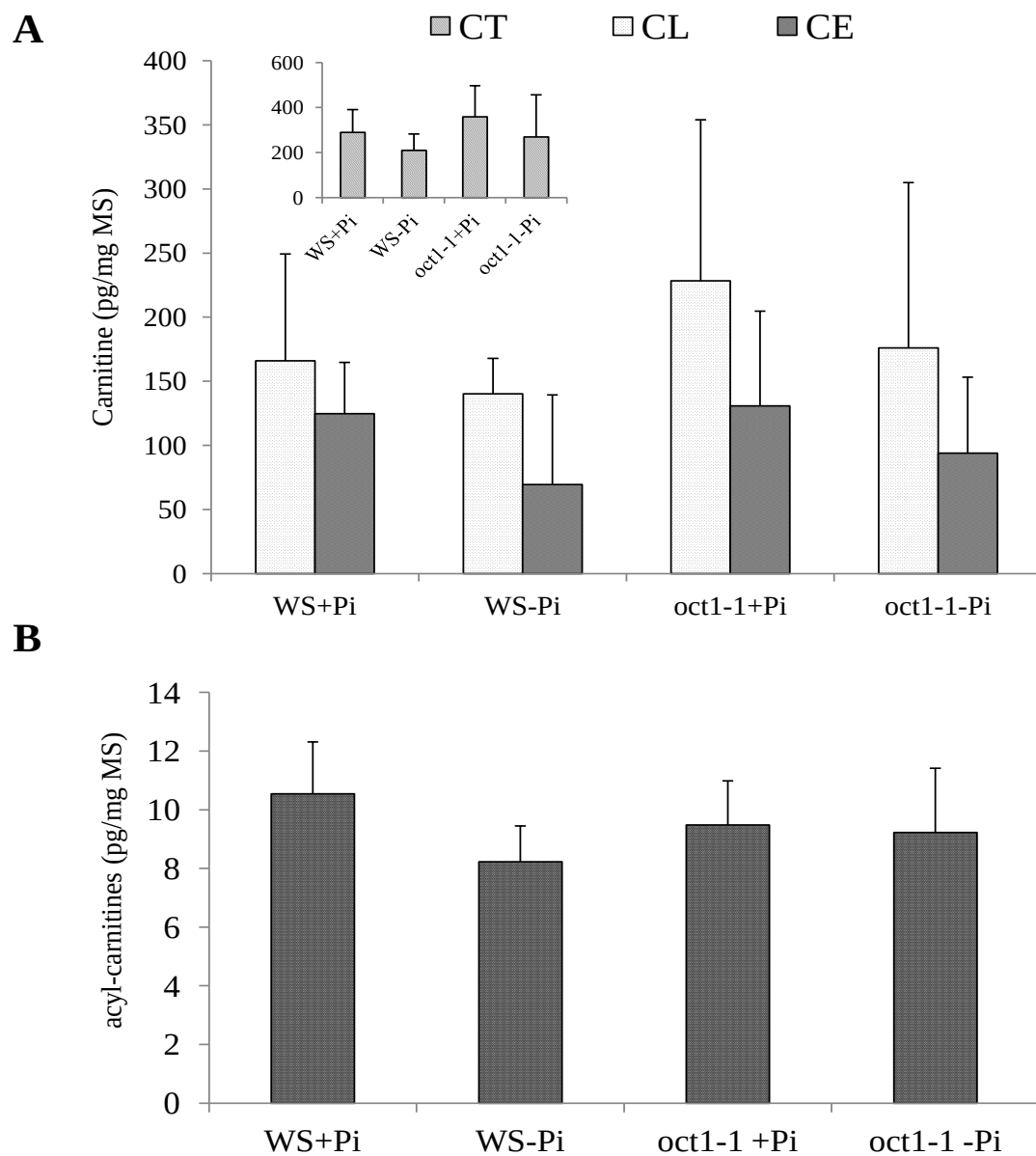


Figure 36 (A) Influence des milieux M&S $\pm$ Pi sur la teneur totale en carnitine (CT, encart de la figure) et des fractions de carnitine libre (CL) et estérifiée (CE) de plantules WS et *oct1-1* à 11 j de développement post-imbibition, 8 j après leur transfert sur les 2 types de milieu **(B)** Teneur cumulée des acyl-carnitines dosées dans les différentes catégories de plantules. Les valeurs sont exprimées en pg/mg de matière sèche et représentent la moyenne $\pm$ écart-type des résultats de trois expérimentations biologiquement indépendantes.

3.1.1. Réponses développementales

Le transfert des plantules à 3 j de développement sur milieu appauvri en phosphate provoque un ralentissement de leur croissance conduisant à leur miniaturisation par rapport aux plantules témoins transférées sur milieu normal (Figure 35A). Les 2 génotypes WS et *oct1-1* présentent un ralentissement comparable du développement. L'analyse de l'architecture racinaire, effectuée sur l'ensemble des plantules, soit au moins 12 plantules pour chacune des 3 répétitions biologiques, montre une inhibition du développement racinaire après 11 j de développement sur milieu -Pi (Figure 35). On mesure en effet une réduction significative de la longueur de la racine principale, du nombre moyen de racines latérales et de leur densité pour les plantules carencées en phosphate. Il apparaît par ailleurs que la réponse au niveau racinaire est similaire entre *oct1-1* et WS.

3.1.2. Dosage des différentes fractions de carnitine

L'analyse des fractions libre et estérifiée de la carnitine dans les plantules WS et *oct1-1* à 11 j ne révèle aucune différence significative en ce qui concerne les teneurs en carnitine totale entre un développement sur milieu appauvri en Pi ou non (Figure 36A, encart). Les teneurs dans les fractions libre et estérifiée ne varient pas non plus entre les différents types de plantules. De la même manière, les plantules des 2 génotypes, carencées ou non en phosphate, présentent des teneurs en acyl-carnitines quasi identiques avec une variabilité moins marquée que pour les fractions libre et estérifiée.

Discussion :

Du point de vue développemental les plantules carencées en Pi présentent, dans nos conditions expérimentales, un retard de croissance qui corrobore d'autres études (Essigmann *et al.*, 1998 ; López-Bucio *et al.*, 2002 ; Karthikeyan *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2006). Nos données concernant le phénotype racinaire montrent par ailleurs une inhibition de la croissance de la racine primaire, en accord avec les autres travaux référencés dans Péret *et al.* (2011), et qui est décrite comme une des réponses adaptatives et non métabolique, à la carence en phosphate. Par contre, dans nos conditions expérimentales, l'appauvrissement du milieu en Pi n'engendre pas une recrudescence du système racinaire latéral contrairement à ce qui est décrit dans certaines études sur *Arabidopsis* (López-Bucio *et al.*, 2003 ; Sanchez-Calderon *et al.*, 2005). Cependant, la réponse du système racinaire latéral vis-à-vis d'une

carence en phosphate semble assez contrastée, dépendant probablement des conditions expérimentales, car d'autres études relatent, comme nous, une inhibition du développement des racines secondaires (Nacry *et al.*, 2005 ; Reymond *et al.*, 2006).

La modification de l'architecture racinaire en tant que réponse locale à l'appauvrissement du milieu en phosphate s'accompagne d'une réponse systémique, se traduisant par une meilleure absorption du phosphate exogène, un meilleur transport, et la remobilisation du phosphate endogène des phospholipides (Péret *et al.*, 2011). Dans le dernier cas, une partie des phospholipides sont transformés en sulfolipides et glycolipides par des voies métaboliques dans lesquelles pourraient intervenir des acyl-carnitines, notamment si des AG sont libérés par des processus d'hydrolyse lipidique à la charge d'une lipase acyl hydrolase (LAH) (Nakamura *et al.*, 2013). Nos résultats ne révèlent aucune modification des teneurs en carnitine totale et en acyl-carnitines, ce qui suggère que les modifications lipidiques engendrées par la carence en phosphate n'impliquent pas la carnitine. Notre expérimentation n'a pas comporté d'analyse vérifiant les changements lipidiques attendus, mais les 8 j de traitements sont en adéquation avec d'autres études (Hartel *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2006). Par contre, il est possible que le dosage des différentes fractions de carnitine après 8 j de carence en phosphate n'ait pas permis de mettre à jour une éventuelle recrudescence des acyl-carnitines correspondant à un remaniement plus précoce du métabolisme lipidique. De plus, les modulations lipidiques en réponse à une carence en Pi étant beaucoup plus prononcées au niveau des racines qu'au niveau de l'appareil aérien (Li *et al.*, 2006), une analyse spécifique des acyl-carnitines dans les racines apporterait des données plus justes.

L'absence de différenciation dans la réponse développementale entre WS et *oct1-1* semble indiquer que la protéine AtOCT1 ne participe pas à la réponse des plantules à la carence en phosphate dans nos conditions expérimentales *in vitro*. Ceci contredit ce que laissait suggérer la surexpression de *AtOCT1* lors d'une carence en phosphate appliquée en condition de développement *in vivo* (Woo *et al.*, 2012). Par ailleurs, nos mesures du système racinaire latéral n'ont pas montré de différence entre WS et *oct1-1* contrairement à ce qui est rapporté par Lelandais *et al.* (2007). L'explication pourrait éventuellement être recherchée dans des conditions différentes de culture, par exemple une teneur moindre en saccharose dans notre milieu M&S (0,5 % contre 1 %).

3.2. Acclimatation au froid

L'acclimatation des plantes au froid implique une modulation du métabolisme lipidique qui va conduire à l'enrichissement des lipides membranaires en AG polyinsaturés afin de maintenir la fluidité des membranes. Dans l'hypothèse où cet enrichissement ferait intervenir un mécanisme d'acyl-editing, tout au moins lors des désaturations extraplastidiales, nous avons envisagé que la carnitine puisse intervenir par exemple dans la gestion du pool cytosolique d'acyl-CoA. Nous avons donc mesuré l'impact d'un traitement par le froid sur les teneurs dans les différentes fractions de carnitine (libre, estérifiée et acyl-carnitines) en étudiant parallèlement l'expression de gènes marqueurs des synthèses lipidiques. Des plantules cultivées pendant 14 j sur milieu M&S en conditions normales de température (24 °C) ont été transférées dans une enceinte présentant des conditions de culture similaires à l'exception d'une température de 7°C. Pour cette expérimentation, l'intensité lumineuse appliquée aux plantules pendant les 14 j de développement à 24°C a été abaissée à 50 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, correspondant à l'intensité reçue dans l'enceinte froide.

3.2.1. Evolution des différentes fractions de carnitine

Une mesure de la température du milieu M&S par une sonde a permis de vérifier que pendant la 1^{ère} heure suivant le transfert, la température appliquée aux plantules décroît de 15 °C, et qu'au cours de la 2^{ème} heure elle est déjà presque stabilisée, ne s'abaissant plus que de 2 °C pour atteindre les 7 °C ambiant (Figure 37).

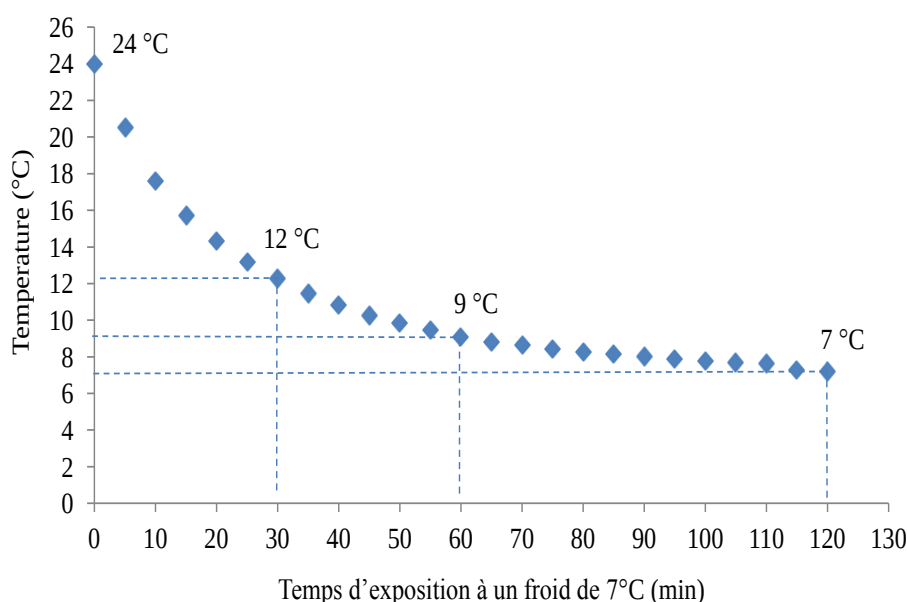


Figure 37 Evolution de la température dans une boîte de pétri contenant du milieu M&S à 24°C et qui est transférée dans un phytotron réfrigéré à 7°C pendant 2 h.

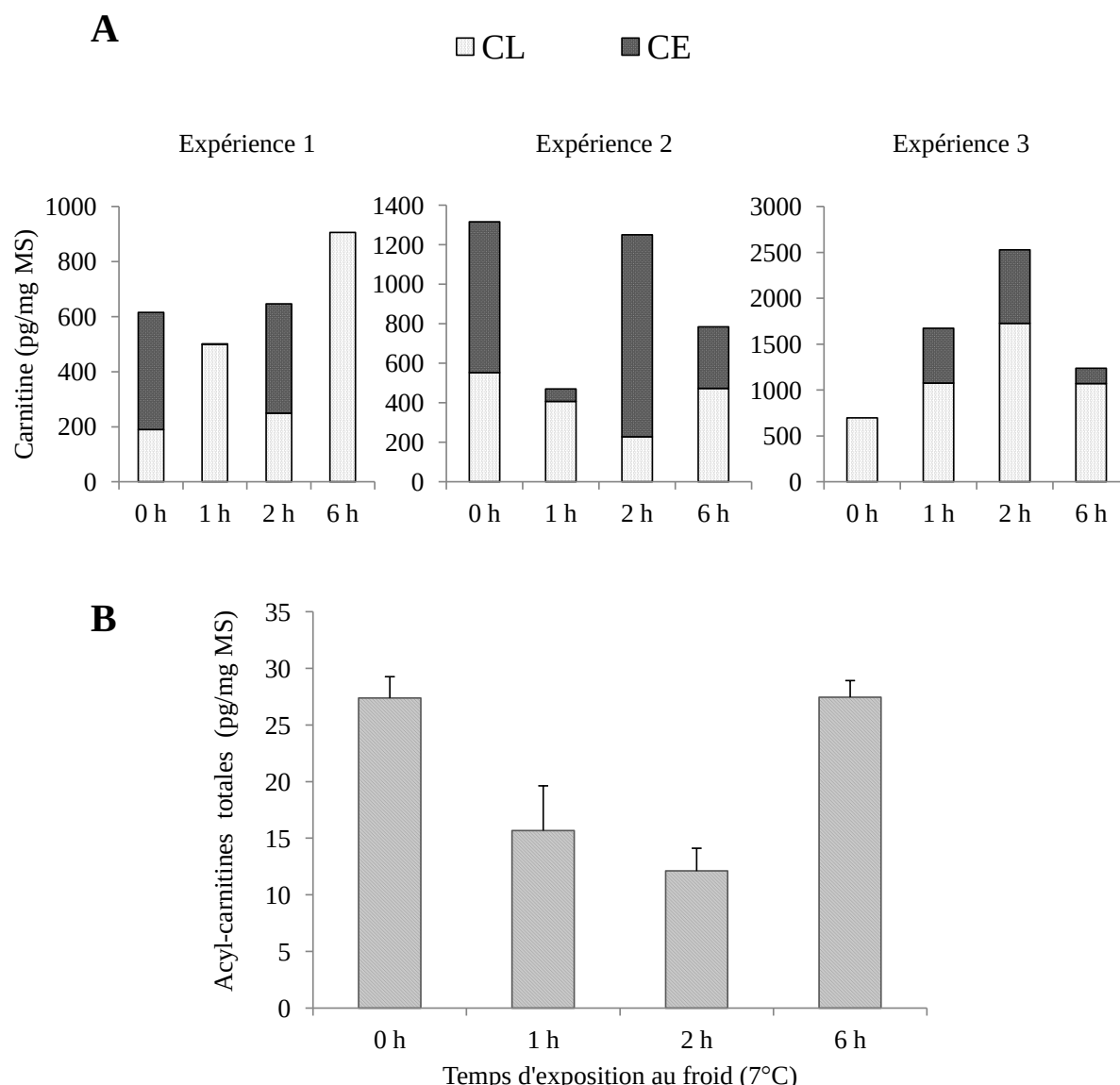


Figure 38 (A) Influence d'une exposition au froid de plantules d'*Arabidopsis* (écotype WS) cultivées pendant 14 j à 24 °C et transférées dans un phytotron réfrigéré à 7°C pendant 0, 1, 2 et 6 h, sur les teneurs en carnitines (**CL**, carnitine libre ; **CE**, carnitine estérifiée ; **CT**, carnitine totale, encart de la figure). **(B)** Teneur cumulée des acyl-carnitines dosées dans les plantules à 0, 1, 2 et 6 h d'exposition au froid. Les valeurs sont exprimées en pg/mg de matière sèche et représentent la moyenne $\pm$ écart-type des résultats de trois expérimentations biologiquement indépendantes.

Les dosages de carnitine révèlent une variation des teneurs en carnitine totale, libre et estérifiée entre les différents échantillons analysés, mais sans analogie entre les 3 répétitions biologiques (Figure 38A). Les plantules ne semblent donc pas répondre au froid par une évolution particulière de la teneur en carnitine ou de sa distribution entre les 2 fractions. En revanche, les résultats obtenus sur les acyl-carnitines montrent une variation similaire des

teneurs pour les 3 répétitions biologiques confirmant une évolution significative au cours de l'acclimatation des plantules au froid (Figure 38B). Ainsi, il apparaît que la teneur en acyl-carnitines diminue progressivement pendant les 2 premières heures d'exposition au froid (passant de 27 à 12 pg/mg MS) puis qu'elle augmente à nouveau jusqu'à sa valeur initiale pendant les 4 heures suivantes. L'évolution de la teneur globale en acyl-carnitines reflète l'évolution de la teneur de chacun des acyl-carnitines dosés (résultats non présentés). A noter qu'aucun signal correspondant à une recrudescence en linoléoyl-carnitine (acyl-carnitine non détecté habituellement du fait d'un rendement faible d'ionisation) n'a pu être détecté dans le cadre du stress froid.

3.2.2. Expression de gènes de la synthèse lipidique

L'analyse de l'expression des différents gènes marqueurs de la synthèse lipidique a été effectuée sur les 3 répétitions biologiques, à partir du même matériel végétal soumis aux quantifications des carnitines. Les résultats de la 1^{ère} expérience (Figure 39) et des deux autres expériences (Annexe 5 et 6) montrent que l'expression de *KAS1*, impliqué dans la synthèse *de novo* d'AG, ne varie pas de manière drastique au cours de l'exposition au froid. Il en est de même concernant *LPAAT1* et *LPAAT2*, qui codent respectivement pour les lysophosphatidic acid acyl-transférases plastidiales et cytosoliques. Pour ces 3 gènes, on peut toutefois percevoir, selon les expériences, une baisse d'expression au cours de la première heure d'exposition, suivie d'un retour vers les valeurs initiales dès la deuxième heure. Une baisse de l'expression de *FATA1*, codant pour la thioestérase de l'oléoyl-ACP, et de *LPCAT2*, codant pour la lysophosphatidylcholine acyl-transférase 2, peut aussi être notée lors des 2 premières heures de traitement malgré une certaine variabilité entre les expériences. Cependant nous mesurons une augmentation significative de l'expression de ces 2 gènes entre 2 h et 6 h pour les 3 expérimentations. Il en est de même, et de manière encore plus marquée, pour *FAD8* qui code pour une désaturase plastidiale. *AtOCT1* suit un profil d'expression très similaire à *FAD8*, bien qu'il soit moins exprimé.

Le placement des plantules au froid induit une surexpression du gène *CBF2*, intégré à l'étude comme marqueur précoce de la réponse au froid. Son expression atteint un maximum 1 h à 2 h suivant le transfert et selon les expériences.

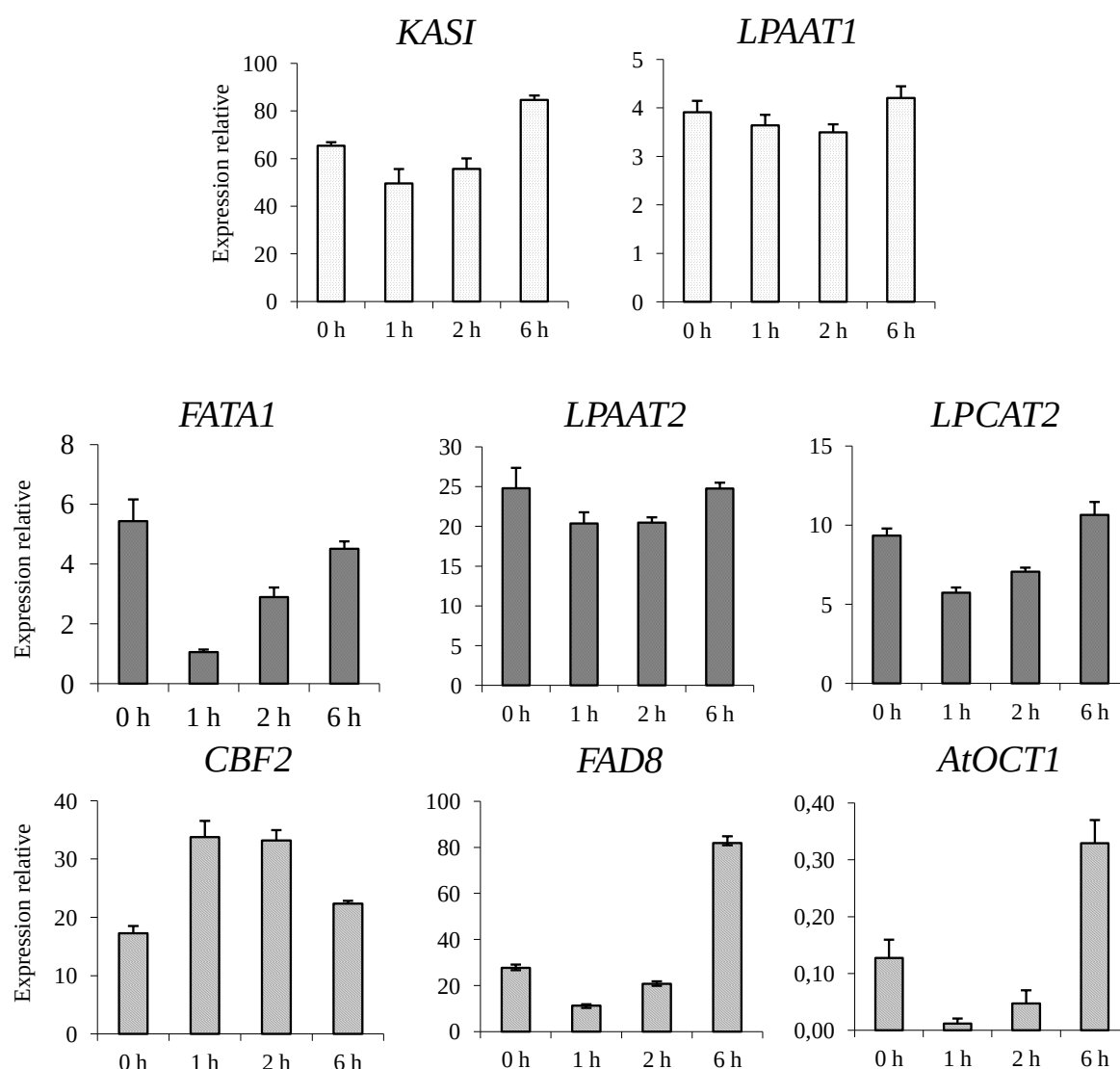


Figure 39 Evolution de l'expression de gènes marqueurs des synthèses lipidiques et de réponse précoce au froid de plantules d'*Arabidopsis* (écotype WS) cultivées pendant 14 j à 24°C et transférées dans un phytotron réfrigéré à 7°C, pendant 0, 1, 2 et 6 h. La quantification de l'expression a été réalisée par PCR quantitative en temps réel et les valeurs sont relatives à l'expression du gène de référence *CLATHRIN* (At5g46630). Abréviations : *KAS I*, gène de la ketoacyl-ACP synthase I ; *FATA1*, gène de l'acyl-ACP thioesterase A isoforme 1 ; *LPAAT1* et *LPAAT2* gène de la lysophosphatidic acid acyl-transférase 1 et 2 ; *LPCAT2*, gène de la lysophosphatidylcholine acyl-transférase 2 ; *CBF2*, gène de la *C-REPEAT/DRE BINDING FACTOR 2* ; *FAD8*, gène de la fatty acid desaturase 8 ; *AtOCT1*, gène de l'organic cation transporter 1.

Discussion :

Le suivi de l'expression de gènes marqueurs des synthèses lipidiques nous permet de situer entre 2 h et 6 h après le transfert des plantules au froid, la mise en place d'une adaptation lipidique pour optimiser le fonctionnement membranaire. Ceci est notamment révélé par l'induction très marquée du gène *FAD8* pendant ce laps de temps, en accord avec la mise en œuvre des processus de désaturation des AG présents sur les phospholipides afin de fluidifier les membranes cellulaires. *CBF2* qui est un marqueur de réponse précoce au froid est surexprimé rapidement dès la première heure d'exposition et précède donc l'induction de *FAD8*. Après les 2 premières heures de transfert au froid, l'expression de *CBF2* diminue, de manière concomitante à l'induction de l'expression de *FAD8*. Nos résultats concordent avec les données de la littérature qui montrent que les gènes appartenant à la famille de *CBF* sont exprimés précocement lors d'une exposition au froid, avec un maximum à 3 h et déclinent progressivement au cours du temps (Zarka *et al.*, 2003). L'induction de ces facteurs de transcription va déclencher les événements nécessaires à l'acclimatation de la plante aux nouvelles conditions de température. La reprise de l'expression de *FATA1* et *LPCAT2*, et de manière moins marquée de *LPAAT1* et *LPAAT2*, entre 2 h et 6 h, corrobore une reprise des synthèses lipidiques pendant cette période faisant suite à un ralentissement du métabolisme lipidique perceptible pendant les 2 premières heures suivant le transfert.

Lorsque nous comparons l'évolution de l'expression des gènes impliqués dans les synthèses lipidiques à l'évolution de la teneur en acyl-carnitines au cours de l'exposition au froid, nous observons un certain parallélisme. La teneur en acyl-carnitines diminue pendant les 2 premières heures du traitement, parallèlement à la diminution apparente de l'activité du métabolisme lipidique, puis rejoint sa valeur initiale entre 2 h et 6 h en même temps que l'activité de synthèse des lipides reprend. Nous ne pouvons pas établir de lien éventuel entre la surexpression de *FAD8* et la recrudescence potentielle de linoléoyl- et linolényl-carnitine qui ne sont pas quantifiables par notre procédé analytique.

Nos résultats montrent par ailleurs qu'*AtOCT1* suit un même profil d'expression que *FAD8*, ce qui suggère une implication du transporteur de cations organiques dans la résistance au froid. *AtOCT1* pourrait notamment véhiculer des cations organiques tels que la carnitine et d'autres bétaines ayant des propriétés cryoprotectrices pour contribuer à l'adaptation de la plante au froid. Notre résultat contredit cependant les données de Küfner & Koch (2008) qui

montrent que si les AtOCT2-6 localisées au niveau du tonoplaste sont surexprimées en réponse aux stress engendré par un déficit hydrique, le froid ou l'hypersalinité, l'expression d'AtOCT1 n'ait pas modifiée.

3.3. Influence de l'ETOMOXIR sur les acyl-carnitines palmitoyl-transférases de la plante

Des études antérieures ont montré l'existence d'une β -oxydation mitochondriale dans différent tissus végétaux qui serait dépendante d'un transport mettant en jeu la carnitine (Masterson & Wood, 2000a). L'étomoxir activé au CoA est connu chez l'animal pour être un inhibiteur irréversible et spécifique de la carnitine palmitoyl-transférase de la membrane externe (CPT1 ou CPTe) des mitochondries (Agius *et al.*, 1991). Masterson & Wood (2009) ont montré que l'étomoxir inhibe également chez la plante la CPT1 dont la β -oxydation mitochondriale dépend, et ont ainsi suggéré le rôle de ce processus au cours du développement post-germinatif et notamment au cours de l'établissement de la photo-autotrophie. D'après cette étude, nous avons cherché à évaluer l'impact de l'étomoxir sur les CPT et le profil en acyl-carnitines au cours du développement post germinatif d'Arabidopsis.

Pour ce faire, nous avons cultivé des plantules sur un milieu M&S et sur un milieu M&S supplémenté de 50 μ M d'étomoxir (ETO). Sur milieu ETO, nous avons prélevé les plantules lorsque ces dernières présentaient un stade de développement proche d'un stade 2 j sur milieu M&S.

Les plantules développées sur milieu ETO présentent un phénotype particulier avec un retard de développement par rapport au contrôle (Figure 40). A 4 j de développement, les plantules sur milieu ETO ont un phénotype proche du contrôle à 2 j. En revanche, un des cotylédons est atrophié et arbore une coloration jaune alors que l'autre est verdissant. La racine primaire ne se développe pas, alors que le contrôle présente une racine primaire allongée. Nous n'observons pas de différences significatives dans les teneurs en carnitines pour les plantules contrôles et les plantules développées sur milieu ETO. De la même manière, le profil et les teneurs en acyl-carnitines sont également identiques pour les 2 conditions, avec une prépondérance en C18:1-, C16:0- et C18:0-carnitine.

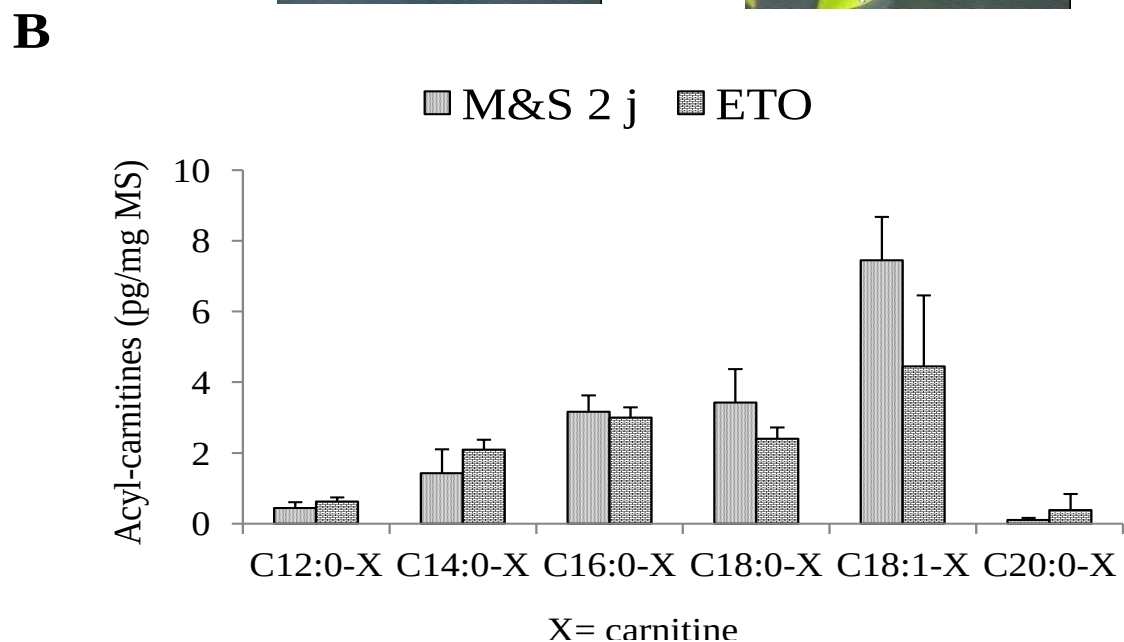
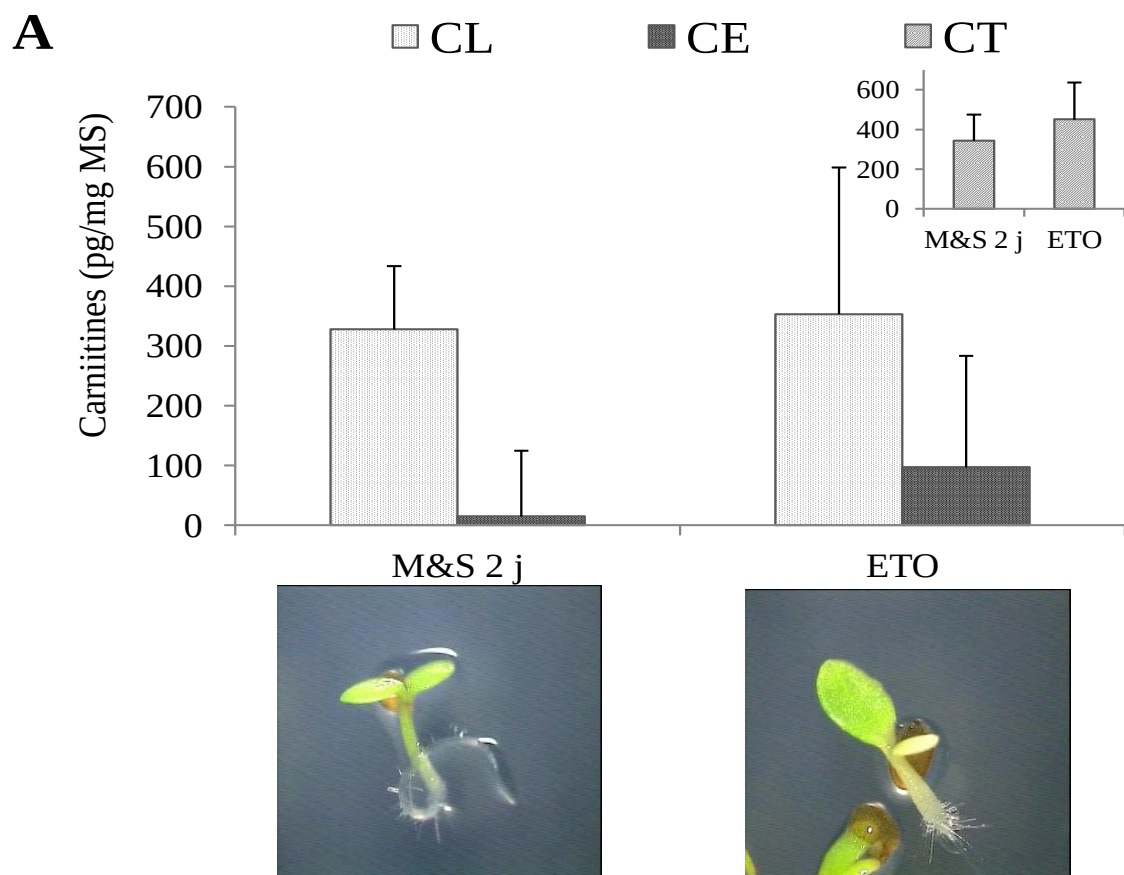


Figure 40 (A)Teneurs en carnitines (CT, carnitine totale, encart de la figure ; CL, carnitine libre ; CE, carnitine estérifiée) et (B) acyl-carnitines de plantules d'Arabidopsis (écotype WS) cultivées *in vitro* sur un milieu M&S supplémenté avec 50 μ M d'étomoxir (ETO) en comparaison de plantules cultivées normalement sur sur milieu M&S à 2 j (M&S 2 j) de développement post-imbition. Les valeurs sont exprimées en pg/mg de matière sèche et représentent la moyenne $\pm$ écart-type des résultats de trois expérimentations biologiquement indépendantes. A revoir les écart types

Discussion :

Le retard de croissance observé lors de notre expérimentation corroborent les données observées par Masterson & Wood (2009) chez les plantules de pois exposées à de l'étomoxir. Le phénotype particulier des cotylédons prouve qu'une partie de l'étomoxir a été métabolisée, mais nous n'expliquons pas ce phénotype particulier. Si l'étomoxir a un effet inhibiteur sur les carnitine palmitoyl-transférases, une diminution dans les teneurs en acyl-carnitines à longue chaîne aurait du être observée entre les plantules traitées avec et sans étomoxir. Pourtant, lorsque nous analysons les teneurs et les profils respectifs en carnitine et en acyl-carnitines, nous n'observons pas de différences. Notons que l'apport d'étomoxir à une concentration plus élevée, inhibe complètement la germination. Il apparaît donc que l'étomoxir dans nos conditions de culture n'aurait pas d'effet sur les activités carnitine acyl-transférases de la plante.

CONCLUSION GENERALE

& PERSPECTIVES

Au cours de ce travail de thèse, nous avons mis en place une méthode de dosage par LC-QQQ-MS/MS intégrant différentes optimisations par rapport à la méthode initiale développée au laboratoire (Thèse B. Bourdin, 2007). L'emploi d'une colonne de chromatographie de type HILIC, de phase stationnaire hydrophile, en remplacement d'une colonne C4, de phase stationnaire hydrophobe, permet aujourd'hui une bonne séparation de la carnitine et de l'acétyl-carnitine et une bonne résolution des pics correspondants. La colonne HILIC n'autorise qu'une faible séparation des acyl-carnitines mais avec une résolution des pics suffisante pour permettre le dosage concomitant de la carnitine, de l'acétyl-carnitine et des acyl-carnitines de longueur de chaîne variable. La disponibilité en composés marqués, carnitine-d₃ et ¹³C-palmitoyl-carnitine, a permis un dosage interne de la carnitine et des acyl-carnitines, en remplacement des quantifications par ajouts dosés, pour une meilleure fiabilité et répétitivité des résultats.

Nos dosages ont ainsi confirmé chez *Arabidopsis* et le colza, la présence d'acyl-carnitines au côté de la carnitine libre, à des teneurs variables tout au long du cycle de vie de la plante. La carnitine s'associe donc à une large gamme d'AG, avec des teneurs plus faibles en acyl-carnitines à chaîne moyenne comparativement aux acyl-carnitines à longue chaîne. L'octanoyl- et la décanoyl-carnitine ont été détectées antérieurement en très faible quantité comparativement aux autres acyl-carnitines dans les différents tissus végétaux analysés (Bourdin *et al.*, 2007), elles ne représentent donc qu'une part négligeable dans le calcul des teneurs cumulées en acyl-carnitines. Pour ces raisons, elles n'ont pas été quantifiées au cours de notre étude, afin de limiter le nombre de transitions traités simultanément et de ne pas affecter la sensibilité d'analyse des acyl-carnitines majoritaires.

La disponibilité d'oléoyl-carnitine commerciale au cours de ma thèse, a rendu possible son dosage dans les extraits végétaux, ce qui n'avait pas été réalisé antérieurement (Bourdin *et al.*, 2007). L'analyse des différents tissus végétaux montre que l'oléoyl-, la palmitoyl- et la stéaroyl-carnitine sont les espèces majoritaires et leurs teneurs cumulées déterminent en grande partie les teneurs en acyl-carnitines totales mesurées. Les 3 acyl-carnitines correspondent aux 3 AG (C18:1, C16:0 et C18:0) principalement synthétisés et exportés des plastides, pour alimenter la synthèse lipidique de la voie eucaryotique. A ce titre, une augmentation significative des teneurs en acyl-carnitines a été mesurée dans des processus développementaux nécessitant une forte synthèse de glycérolipides, tels que le développement post-germinatif (2 j post-imbibition) ou lors de l'organogenèse racinaire, en concomitance

avec le niveau d'expression des gènes marqueurs de la synthèse lipidique eucaryotique (*FATA*, *LPAAT2* et *LPCAT2*). De plus, lors d'une exposition au froid des plantules d'*Arabidopsis*, le ralentissement de la synthèse lipidique est accompagné d'une diminution progressive de la teneur totale en acyl-carnitines, qui retourne à son niveau initial lorsque la plante s'est acclimatée et que la synthèse lipidique reprend une activité plus soutenue. Cette diminution progressive des teneurs en acyl-carnitines pourrait correspondre à un ralentissement de l'activité des carnitine transférases et/ou à une utilisation des acyl-carnitines (qui ne sont pas régénérées en parallèle), pour supporter éventuellement le besoin lipidique normal ou nécessaire à une acclimatation précoce de la plante au froid. La carnitine interviendrait alors dans la prise en charge des AG en vue de leur transport et/ou représenterait une forme de réserve d'AG activés. Les résultats confortent à nouveau le lien existant entre métabolisme lipidique et la carnitine chez la plante. Plus particulièrement, en plus des études antérieures rapportant la mesure d'activités carnitine transférase dans des plastes (Thomas *et al.*, 1983 ; McLaren *et al.*, 1985 ; Masterson & Wood, 2000b), les données confondues laissent envisager une contribution possible de la carnitine dans la prise en charge et l'exportation des AG du plaste pour participer à la synthèse de lipides eucaryotiques chez la plante.

Au cours de l'embryogénèse, la prépondérance en acyl-carnitines est observée lors de la phase de croissance et de différenciation cellulaire amenant à la formation de l'embryon de colza (15 premiers jours après floraison), suggérant également un rôle potentiel de ces esters de carnitine au cours de ce stade de développement où la synthèse membranaire est active. En revanche, pendant la phase de remplissage de la graine, les teneurs en acyl-carnitines diminuent significativement. Si les acyl-carnitines sont impliquées dans l'exportation et la synthèse des glycérolipides eucaryotiques, une augmentation concomitante en acyl-carnitines aurait dû être observée pendant la phase d'accumulation rapide des TAG dans l'embryon, or ce n'est pas le cas. Il apparaît donc que la carnitine n'est pas ou est moins impliquée dans la synthèse de glycérolipides de type TAG. De plus, l'analyse du mutant *fatb-ko* ne montre pas de différences dans les teneurs en acyl-carnitines et notamment en terme de palmitoyl- et de stéaroyl-carnitine par rapport à son écotype sauvage WS. Ce mutant est affecté dans l'hydrolyse des acyl-ACP à longue chaîne saturée destinée à l'exportation vers la voie eucaryotique. Cette mutation entraîne une diminution (de l'ordre de 50%) de la composition en AG saturés des phosphoglycérolipides eucaryotiques et de la teneur totale en cire

(Bonaventure *et al.*, 2003). En revanche, la composition lipidique des sphingolipides, dont la synthèse des sphingolipides dépend, est inchangée, suggérant l'existence de mécanismes potentiels dépendant de la carnitine par exemple, qui permettraient de préserver la composition en AG de ces lipides adéquats avec leurs rôles biologiques. Il a été notamment rapporté que dans des cellules érythrocytaires (globules rouges ou hématies), les acyl-carnitines constitueraient une réserve d'acyles activés pour alimenter les phosphoglycérolipides des membranes des mitochondries (Arduini *et al.*, 2002). La palmitoyl-carnitine pourrait également intervenir dans la modulation de l'activité de protéines par palmitoylation (Nalecz *et al.*, 2007). De la même manière, la présence de mirystoyl-carnitine pourrait être reliée au processus de mirystoylation chez la plante (Ishitani *et al.*, 2000). Ainsi, de manière plus générale, il est envisageable que la carnitine soit impliquée dans la prise en charge et l'exportation d'AG qui contribueraient à la synthèse de lipides membranaires, de lipides particuliers et/ou de composés dérivés. Ce système dépendant de la carnitine et des activités enzymatiques associées, seraient plus ou moins actif en fonction du stade de développement, du type de tissu et de l'organe. En complément des analyses d'acyl-carnitines, et de l'expression de gènes marqueurs de la synthèse lipidique, la mesure d'activités carnitine transférase nous donnerait une information supplémentaire concernant la dynamique de formation des acyl-carnitines. Nous pourrions ainsi évaluer si la présence des acyl-carnitines mesurées est une forme de réserve et/ou de transport d'AG activés en fonction du stade de développement et des processus biologiques étudiés. A ce titre, nous mettons au point actuellement au laboratoire une mesure de l'activité carnitine palmitoyl-transférase par dosage LC-QQQ-MS/MS, adaptée de la méthode développée par van Vlies *et al.* (2006) à partir de fibroblastes d'épiderme humain. D'autre part, le double mutant d'*Arabidopsis fata1:fata2* présente une diminution des activités thioesterases FATA, des teneurs en huile et un profil en AG modifié dans les graines d'*Arabidopsis* (Moreno-Pérez *et al.*, 2012). L'analyse prochaine de ce double mutant, ainsi que de mutants disponibles affectés dans la synthèse lipidique de la voie procaryotique ou eucaryotique (*ats1*, *fatb:ats1*, *wri1*) ou dans la biosynthèse de la carnitine nous permettra de mieux évaluer le rôle de la carnitine dans le trafic intracellulaire et le métabolisme lipidique.

Chez la plante, le peroxyosome serait le site principal de β -oxydation, mais des études ont montré l'existence controversée d'une β -oxydation mitochondriale et des activités enzymatiques associées dont le système de transport dépendant de la carnitine (Burgess &

Thomas, 1986 ; Thomas & Wood, 1986 ; Schwabedissen-Gerbling & Gerhardt, 1995 ; Masterson & Wood, 2000a). De plus, il apparaît que le plaste ne soit pas l'unique site de synthèse *de novo* des AG et que la mitochondrie possède son propre système enzymatique nécessaire à la synthèse d'AG saturés, mais dépourvu de l'acétyl-CoA carboxylase (Gueguen *et al.*, 2000). A partir d'un extrait protéique soluble de mitochondries de feuilles de pois et l'ajout d'un mélange réactionnel contenant notamment du malonate et des ACP, il a été détecté majoritairement par LC-MS/MS la présence de la C8:0-, la C16:0- et la C18:0-ACP et plus minoritairement la C10:0-, la C12:0-, la C14:0-ACP et des intermédiaires hydroxylés. Ainsi, il n'est pas à exclure qu'une partie du pool d'esters de carnitine mesurée dans nos échantillons végétaux puisse également provenir de l'activité métabolique de la mitochondrie. Par ailleurs, au cours de nos études, nous avons mis en évidence dans la plupart de nos échantillons biologiques la présence d'acétyl-carnitine qui corrobore les activités carnitine acétyl-transférase mesurées dans des extraits mitochondriaux de cotylédons et plastidiaux de feuilles de pois ou bien dans des étio-chloroplastes de feuilles d'orge en verdissement (Thomas *et al.*, 1983 ; Burgess & Thomas, 1986 ; Masterson & Wood, 2000b). Les teneurs sont fluctuantes suggérant que ce composé pourrait être une forme de réserve d'acétate métabolisée en fonction des besoins de la plante et/ou permettrait de tamponner le ratio acétyl-CoA/CoA pour le maintien d'un pool suffisant de coenzyme A comme c'est le cas chez l'animal (Ramsay & Zammit, 2004 ; Stephens *et al.*, 2007). L'origine des acétyl-carnitines pourrait être reliée aux processus de β -oxydation peroxysomale et/ou mitochondriale et de leur exportation des organites respectifs. Pourtant à ce jour, aucune étude n'a mis en évidence la présence de carnitine acyl-transférases d'origine peroxysomale alors que des activités carnitine acétyl-transférases ont bien été mesurées dans des mitochondries de tissus végétaux. De plus, au cours de la post-germination il a été montré que la β -oxydation mitochondriale est essentielle à l'établissement de la jeune plantule lors du passage de la phase hétérotrophe vers la phase autotrophe (Masterson & Wood, 2009). En effet, l'acétate issu de la β -oxydation mitochondriale et estérifié à la carnitine, serait exporté vers le plaste et constituerait une source possible d'unité C2:0 une fois activée au coenzyme A (par action de l'acétyl-CoA synthétase plastidiale, ACS) pour alimenter la synthèse d'AG et/ou d'hormones (Masterson & Wood, 2009). Cependant des études de génétique inverse et de flux métaboliques ont montré que l'importation d'acétate couplée à l'activité de l'ACS, n'est pas la source principale d'acétate activé au cours du développement de la plante (Lin & Olivier, 2008). En effet, la pyruvate déshydrogénase plastidiale alimente en grande partie les besoins en acétate, à partir

de pyruvate, nécessaires à la synthèse des AG. Il apparaît donc que la β -oxydation mitochondriale, et la production d'acétyl-carnitines associée, pourrait constituer une source alternative de substrats pour alimenter le métabolisme plastidial et serait active en fonction du stade de développement (Masterson & Wood, 2009). Le dosage d'acyl-carnitines réalisé par notre équipe au coté des activités carnitine transférase mesurées dans des mitochondries et des chloroplastes de tissus végétaux, justifieraient l'intérêt de réaliser un fractionnement subcellulaire de ces organites pour déterminer les teneurs en carnitine et en acyl-carnitines. Ces données nous permettraient de mieux comprendre les rôles métaboliques de la carnitine au sein de la plante.

D'autre part, la comparaison des teneurs en acyl-carnitines et en carnitine estérifiée a révélée un résultat inédit montrant qu'une grande fraction de la carnitine est estérifiée à des AG inhabituels ou des acides organiques encore non identifiés dans les plantes, autres que l'acétyl- et les acyl-carnitines mesurés. Une analyse réalisée par LC-qTOF-MS/MS, nous a révélé que la carnitine pourrait être associée à au moins 5 candidats potentiels et avec une forte prépondérance par rapport aux acyl-carnitines quantifiées dans nos échantillons. L'identification de ces esters de carnitine pourrait nous permettre de mieux appréhender les rôles biologiques de la carnitine, comme une implication dans la prise en charge, le transport et/ou le recyclage d'acides organiques inattendus (hormones, AG ou lipides particuliers ou anormaux...). Ainsi, la carnitine pourrait être impliquée par exemple dans la détoxification des cellules, en éliminant les AG atypiques comme chez l'animal où les xénobiotiques de type valproate et pivalate, non dégradables par la β -oxydation mitochondriale, sont pris en charge par la carnitine pour être éliminés de la cellule (Brass, 2002 ; Onishi *et al.*, 2008). Notons qu'au cours de l'extraction de nos échantillons nous obtenons un extrait complexe dont les différents composés peuvent interférer dans la séparation, l'ionisation et l'analyse des esters de carnitine. Par ailleurs, dans le cas de l'acétyl-carnitine et des acyl-carnitines, la polarité de ces composés est variable, elle est notamment fonction du nombre d'insaturations et est inversement proportionnelle à la longueur de la chaîne carbonée. Ces données suggèrent que la carnitine est probablement associée à des acides organiques de polarité diverse. Pour continuer cette analyse des esters de carnitine, nous envisageons d'ajouter une étape d'extraction en phase solide (SPE) pour simplifier, concentrer et séparer les fractions contenant les composés polaires et apolaires de nos échantillons biologiques. Ces dernières seront respectivement analysées à l'aide d'une colonne polaire de type HILIC et une colonne

apolaire de type C18 couplée à la qTOF-MS/MS. Enfin, l'isolement et la purification des candidats d'intérêt par chromatographie liquide semi-préparative, nous permettrait ensuite de les étudier par exemple par spectroscopie infrarouge qui pourrait donner des informations potentielles sur la nature des composés.

Jusqu'à présent, nous n'avons pas disposé de mutants de biosynthèse de la carnitine ou de mutants perte de fonction de carnitine transférases, seul le mutant *oct1-1* affecté dans la prise en charge de la carnitine étant disponible (Lelandais-Brière *et al.*, 2007). Les analyses par PCR quantitative en temps réel révèle que *AtOCT1* est fortement exprimé lors de l'imbibition (stade 1 j) de la graine. Ces résultats suggèrent une implication possible de *AtOCT1* dans la régulation de l'homéostasie de cations organiques tels que la carnitine ou la proline, qui par leur propriété osmoprotectante et antioxydante protégeraient contre le stress éventuel occasionné lors de l'imbibition de la graine. Nous avons notamment montré que la carnitine au même titre que la proline est un osmolyte et améliore les conditions physiologiques de la plantule face à un stress hydrique (Charrier *et al.*, 2012). De plus, dans des plantules d'*Arabidopsis* âgées de 3 semaines, il a également été montré que l'expression des gènes appartenant à la famille des *AtOCT* est modulée différemment en condition de stress (Küfner & Koch, 2008). L'organogénèse racinaire induit également une surexpression d'*AtOCT1* et une augmentation des teneurs en carnitine par rapport aux feuilles ou aux cals. Ce transporteur de cations organiques pourrait intervenir dans l'homéostasie d'osmolytes tels que la carnitine pour maintenir un potentiel hydrique favorable à la captation d'eau dans les racines. Pourtant, le phénotype même d'*oct1-1* n'étaye pas cette hypothèse. En effet, la formation des racines latérales est réprimée lorsque les plantules d'*Arabidopsis* sont cultivées sur un milieu de culture avec un potentiel osmotique faible induisant un stress hydrique (Deak & Malamy, 2005 ; Royce & Malamy, 2011). Dans le cas du mutant *oct1-1*, si on considère qu'il est moins apte à accumuler des osmolytes (dont la carnitine) dans les racines, le potentiel hydrique dans les racines d'*oct1-1*, devrait être plus élevé que son écotype sauvage WS. Par conséquent, un stress hydrique devrait être perçu et induire une diminution de la densité de racines latérales. Pourtant, le mutant *oct1-1* en condition *in vitro*, présente un accroissement de la densité de racines latérales par rapport à son contrôle sauvage (Lelandais *et al.*, 2007), que nous n'avons pas observé dans le cadre nos études. Ces données suggèrent un rôle plus général d'*AtOCT1* dans le transport de composés tels que la carnitine qui pourraient participer à la régulation de la synthèse racinaire. A ce titre, Lelandais-Brière *et al.* 2007 et B. Bourdin

au cours de sa thèse (2007), ont observé qu'une supplémentation du milieu de culture avec de la carnitine induit une augmentation de la densité de racines latérales de la plantule. Il apparaît que l'ABA est un signal répresseur et l'auxine un signal promoteur de l'initiation et la formation des racines latérales (Deak & Malamy, 2005 ; Péret *et al.*, 2011). Une modulation de la balance hormonale ABA/Auxine agit directement sur l'architecture racinaire. Or une analyse par puces à ADN a révélée que l'apport de carnitine dans le milieu de culture induit une régulation antagoniste de la voie de l'ABA dans des plantules d'*Arabidopsis* (Charrier *et al.*, 2012), ce qui pourrait expliquer le phénotype décrit plus tôt. D'autant plus que chez l'animal il a été rapporté que la carnitine pouvait être un régulateur de récepteurs protéiques impliqués notamment dans la réponse aux glucocorticoïdes ou aux hormones thyroïdiennes (Manoli *et al.*, 2004 ; Benvenga *et al.*, 2004). Enfin, au cours d'une exposition au froid de plantules d'*Arabidopsis* âgées de 15 j, *AtOCT1* est également induit et laisse envisager un rôle possible d'*AtOCT1* dans l'homéostasie de cations organiques avec des propriétés cryoprotectrices tels que la carnitine, comme chez les bactéries (Angelidis & Smith, 2003a). En revanche, nous ne confirmons pas les résultats de Küfner & Koch (2008) qui rapportent qu'*AtOCT1* n'est pas exprimé en condition de stress froid contrairement à *AtOCT3* et *AtOCT5*. Les données sur *AtOCT1* laissent penser que ce dernier contribue certes au transport de cations organiques tels que la carnitine, mais il ne s'agit pas de son substrat unique (Lelandais-Brière *et al.*, 2007). Ainsi, sur l'ensemble des expériences menées et incluant *oct1-1*, le mutant n'a pas présenté de différence phénotypique et de teneurs en carnitine avec son écotype sauvage WS, suggérant que d'autres transporteurs peuvent prendre en charge la carnitine.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

Agius, L., Peak, M. & Sherratt, H. S. A. Differences between human, rat, guinea pig hepatocyte cultures. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 1711–15 (1991).

Alpert, A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J. Chromatogr.* **499**, 177–96 (1990).

Angelidis, A. S. & Smith, G. M. Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7492–98 (2003a).

Angelidis, A. S. & Smith, G. M. Three transporters mediate uptake of glycine betaine and carnitine by *Listeria monocytogenes* in response to hyperosmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1013–22 (2003b).

Antonenkov, V. D. & Hiltunen, J. K. Transfer of metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **1822**, 1374–86 (2012).

Arduini, A., Mancinelli, G., Radatti, G. L., Dottori, S., Molajoni, F. & Ramsay, R. R. Role of carnitine and carnitine palmitoyltransferase as integral components of the pathway for membrane phospholipid fatty acid turnover in intact human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **267**, 12673–81 (1992).

Ariffin, A., Mcneil, P. H., Cooke, R. J., Woods, C. & Thomasbij, D. R. Carnitine content of greening barley leaves. *Phytochemistry.* **21**, 1431–32 (1982).

Artus, N. N., Uemura, M., Steponkus, P. L., Gilmour, S. J., Lin, C. & Thomashow, M. F. Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* *COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13404–09 (1996).

Aznar-Moreno, J. A., Martínez-Force, E., Venegas-Calación, M., Garcés, R. & Salas, J. J. Changes in acyl-coenzyme A pools in sunflower seeds with modified fatty acid composition. *Phytochemistry.* **87**, 39–50 (2013).

Aznar-Moreno, J. A., Venegas Calación, M., Martínez-Force, E., Garcés, R., Mullen, R., Gidda, S. K. & Salas, J. J. Sunflower (*Helianthus annuus*) long-chain acyl-coenzyme A synthetases expressed at high levels in developing seeds. *Physiol. Plant.* **150**, 360–73 (2014).

B

Bahl, J., Francke, B. & Monéger, R. Lipid composition of envelopes, prolamellar bodies and other plastid membranes in etiolated, green and greening wheat leaves. *Planta* **129**, 193–201 (1976).

- Bao, X., Focke, M., Pollard, M. & Ohlrogge, J.** Understanding in vivo carbon precursor supply for fatty acid synthesis in leaf tissue. *Plant J.* **22**, 39–50 (2000).
- Bates, P. D., Durrett, T. P., Ohlrogge, J. B. & Pollard, M.** Analysis of acyl fluxes through multiple pathways of triacylglycerol synthesis in developing soybean embryos. *Plant Physiol.* **150**, 55–72 (2009).
- Bates, P. D., Fatihi, A., Snapp, A. R., Carlsson, A. S., Browse, J. A. & Lu, C.** Acyl editing and headgroup exchange are the major mechanisms that direct polyunsaturated fatty acid flux into triacylglycerols. *Plant Physiol.* **160**, 1530–39 (2012).
- Benning, C.** Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**, 71–91 (2009).
- Benvenga, S., Amato, A., Calvani, M. & Trimarchi, F.** Effects of carnitine on thyroid hormone action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1033**, 158–67 (2004).
- Bhatla, S. C., Vandana, S. & Kaushik, V.** Recent developments in the localization of oil body-associated signaling molecules during lipolysis in oilseeds. *Plant Signal. Behav.* **4**, 176–82 (2009).
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* **37**, 911–17 (1959).
- Bode, K., Hooks, M. & Couee, I.** Identification, separation, and characterization of acyl-coenzyme A dehydrogenases involved in mitochondrial β -oxidation in higher plants. *Plant Physiol.* **119**, 1305–14 (1999).
- Bonaventure, G., Salas, J. J., Pollard, M. R. & Ohlrogge, J. B.** Disruption of the *FATB* gene in *Arabidopsis* demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *The Plant cell.* **15**, 1020–33 (2003).
- Bourdin, B., Adenier, H. & Perrin, Y.** Carnitine is associated with fatty acid metabolism in plants. *Plant Physiol. Biochem.* **45**, 926–31 (2007).
- Brass, E. P.** Pivalate-generating prodrugs and carnitine homeostasis in man. *Pharmacol. Rev.* **54**, 589–98 (2002).
- Browse, J., Warwick, N., Somerville, C. R. & Slack, C. R.** Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the “16:3” plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* **235**, 25–31 (1986).
- Browse, J., McConn, M., James, D., Jr, T. & Miquels, M.** Mutants of *Arabidopsis* deficient in the synthesis of α -linolenate. *J. Biol. Chem.* **268**, 16345–51 (1993).
- Burgess, N. & Thomas, D. R.** Carnitine acetyltransferase in pea cotyledon mitochondria. *Planta.* **167**, 58–65 (1986).

Caiveau, O., Fortune, D., Cantrel, C., Zachowski, A. & Moreau, F. Consequences of ω -6-oleate desaturase deficiency on lipid dynamics and functional properties of mitochondrial membranes of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **276**, 5788–94 (2001).

Calabrese, V., Ravagna, A., Colombrita, C., Scapagnini, G., Guagliano, E., Calvani, M., Butterfield, D. A. & Giuffrida Stella, A. M. Acetylcarnitine induces heme oxygenase in rat astrocytes and protects against oxidative stress: involvement of the transcription factor Nrf2. *J. Neurosci. Res.* **79**, 509–21 (2005).

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

Campanoni, P. & Blatt, M. R. Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes. *J. Exp. Bot.* **58**, 65–74 (2007).

Canovas, M., Bernal, V., Sevilla, A. & Iborra, J. L. Salt stress effects on the central and carnitine metabolisms of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **96**, 722–37 (2007).

Cerderblad, G. & Lindstedt, S. A method is described for the determination of carnitine in picomole range. *Clin. Chim. Acta.* **37**, 235–43 (1972).

Chalkraft, R. K. & Britz-McKibbin, P. Newborn screening of inborn errors of metabolism by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry: a second-tier method with improved specificity and sensitivity. *Anal. Chem.* **81**, 307–14 (2009).

Charrier, A., Rippa, S., Yu, A., Nguyen, P. J., Renou, J.-P. & Perrin, Y. The effect of carnitine on *Arabidopsis* development and recovery in salt stress conditions. *Planta* **235**, 123–35 (2012).

Constantin-Teodosiu, D., Cederblad, G. & Hultman, E. PDC activity and acetyl group accumulation in skeletal muscle during prolonged exercise. *J. Appl. Physiol.* **73**, 2403–07 (1992).

Costa, C. G., Struys, E. A., Bootsma, A., Ten Brink, H. J., Dorland, L., Tavares de Almeida, I., Duran, M. & Jakobs, C. Quantitative analysis of plasma acylcarnitines using gas chromatography chemical ionization mass fragmentography. *J. Lipid Res.* **38**, 173–82 (1997).

Cotton, L. M., Rodriguez, C. M., Suzuki, K., Orgebin-Crist, M.-C. & Hinton, B. T. Organic cation/carnitine transporter, OCTN2, transcriptional activity is regulated by osmotic stress in epididymal cells. *Mol. Reprod. Dev.* **77**, 114–25 (2010).

Deak, K. I. & Malamy, J. Osmotic regulation of root system architecture. *Plant J.* **43**, 17–28 (2005).

Dieuaide, M., Brouquisse, R., Pradet, A. & Raymond, P. Increased fatty acid β -oxidation after glucose starvation in maize root tips. *Plant Physiol.* **99**, 595–600 (1992).

Dieuaide, M., Couée, I., Pradet, A. & Raymond, P. Effects of glucose starvation on the oxidation of fatty acids by maize root tip mitochondria and peroxisomes: evidence for mitochondrial fatty acid β -oxidation and acyl-CoA dehydrogenase activity in a higher plant. *Biochem. J.* **296**, 199–207 (1993).

Enomoto, A., Wempe, M. F., Tsuchida, Hiroki., Shin, H. J., Cha, S. Ho., Anzai, N., Goto, A., Sakamoto, A., Niwa, T., Kanai, Y., Anders, M. W. & Endou, H. Molecular identification of a novel carnitine transporter specific to human testis. *J. Biol. Chem.* **277**, 36262–71 (2002).

Essigmann, B., Güler, S., Narang, R. A., Linke, D. & Benning, C. Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of *SQD1*, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1950–55 (1998).

F

Focks, N. & Benning, C. Wrinkled1: A novel, low-seed-oil mutant of *Arabidopsis* with a deficiency in the seed-specific regulation of carbohydrate metabolism. *Plant Physiol.* **118**, 91–101 (1998).

Footitt, S., Slocombe, S. P., Lerner, V., Kurup, S., Wu, Y., Larson, T., Graham, I. A., Baker, A. & Holdsworth, M. Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the *Arabidopsis* homologue of human ALDP. *EMBO J.* **21**, 2912–22 (2002).

Fraenkel, G. Effect and distribution of vitamin BT. *Arch. Biochem. Biophys.* **34**, 457–67 (1951).

Fraser, F. & Zammit, V. A. Submitochondrial and subcellular distributions of the carnitine-acylcarnitine carrier. **445**, 41–44 (1999).

Fulda, M., Schnurr, J., Abbadi, A., Heinz, E. & Browse, J. Peroxisomal acyl-CoA synthetase activity is essential for seedling development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell.* **16**, 394–405 (2004).

Gerbling, H. & Gerhardt, B. Oxidative decarboxylation of branched-chain 2-oxo fatty acids by higher plant peroxisomes. *Plant Physiol.* **88**, 13–15 (1988).

Gidda, S. K., Shockey, J. M., Rothstein, S. J., Dyer, J. M. & Mullen, R. T. *Arabidopsis thaliana* GPAT8 and GPAT9 are localized to the ER and possess distinct ER retrieval signals: functional divergence of the dilysine ER retrieval motif in plant cells. *Plant Physiol. Biochem.* **47**, 867–79 (2009).

Gómez-Amores, L., Mate, A., Revilla, E., Santa-María, C. & Vázquez, C. M. Antioxidant activity of propionyl-L-carnitine in liver and heart of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* **78**, 1945–52 (2006).

Graham, I. A. & Eastmond, P. J. Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Prog. Lipid Res.* **41**, 156–81 (2002).

Gueguen, V., Macherel, D., Jaquinod, M., Douce, R. & Bourguignon, J. Fatty acid and lipoic acid biosynthesis in higher plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* **275**, 5016–25 (2000).

Gülçin, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci.* **78**, 803–11 (2006).

Gulewitsch, V. & Krimberg, R. Zur Kenntnis der Extraktionsstoffe der Muskeln. 2.Mitteilung über das Carnitin. *Physiol. Chem.* **45**, 326–30 (1905).

Gutierrez, L., Bussell, J. D., Pacurar, D. I., Schwambach, J., Pacurar, M. & Bellini, C. Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of *AUXIN RESPONSE FACTOR* transcripts and microRNA abundance. *The Plant cell.* **21**, 3119–32 (2009).

H, I & J

Hammond, J. P., Broadley, M. R. & White, P. J. Genetic responses to phosphorus deficiency. *Ann. Bot.* **94**, 323–32 (2004).

Härtel, H., Dormann, P. & Benning, C. DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 10649–54 (2000).

Harwood, J. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta.* **1301**, 07–56 (1996).

Heinig, K. & Henion, J. Determination of carnitine and acylcarnitines in biological samples by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **735**, 171–88 (1999).

Hettema, E. H. & Tabak, H. F. Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **1486**, 18–27 (2000).

Hoppe, A. & Theimer, R. R. Enzymes for lipolysis and fatty acid metabolism in different organelle fractions from rape seed cotyledons. *Planta.* **202**, 227–34 (1997).

Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C. S., Shi, W. & Zhu, J. K. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *The Plant cell.* **12**, 1667–78 (2000).

Jouhet, J., Maréchal, E., Baldan, B., Bligny, R., Joyard, J. & Block, M. A. Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J. Cell Biol.* **167**, 863–74 (2004).

Jouhet, J., Maréchal, E. & Block, M. A. Glycerolipid transfer for the building of membranes in plant cells. *Prog. Lipid Res.* **46**, 37–55 (2007).

K

Kamp, F. & Hamilton, J. A. How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* **75**, 149–59 (2006).

Karthikeyan, A. S., Varadarajan, D. K., Mukatira, U. T., Urzo, M. P. D., Damsz, B. & Raghothama, K. G. Regulated expression of Arabidopsis phosphate transporters 1. *Plant Physiol.* **130**, 221–33 (2002).

Kaup, M. T., Froese, C. D. & Thompson, J. E. A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. *Plant Physiol.* **129**, 1616–26 (2002).

Kemp, S., Theodoulou, F. L. & Wanders, R. J. A. Mammalian peroxisomal ABC transporters: from endogenous substrates to pathology and clinical significance. *Br. J. Pharmacol.* **164**, 1753–66 (2011).

Kim, H. U., Hsieh, K., Ratnayake, C. & Huang, A. H. C. A novel group of oleosins is present inside the pollen of Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **277**, 22677–84 (2002).

Kim, H. U. & Huang, A. H. C. Plastid lysophosphatidyl acyltransferase is essential for embryo development in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* **134**, 1206–16 (2004).

Kim, H. U., Li, Y. & Huang, A. H. C. Ubiquitous and endoplasmic reticulum – located lysophosphatidyl acyltransferase, LPAT2, is essential for female but not male gametophyte development in Arabidopsis. *The Plant Cell.* **17**, 1073–89 (2005).

Kivilompolo, M., Öhrnberg, L., Orešič, M. & Hyötyläinen, T. Rapid quantitative analysis of carnitine and acylcarnitines by ultra-high performance-hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1292**, 189–94 (2013).

Konishi, T., Shinohara, K., Yamada, K. & Sasaki, Y. Acetyl-CoA carboxylase in higher Plants : most plants other than gramineae have both the prokaryotic and the eukaryotic forms of this enzyme. *Plant Cell Physiol.* **37**, 117–22 (1996).

Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Vothknecht, U. C. & Westhoff, P. *VIPP1*, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4238–42 (2001).

Küfner, I. & Koch, W. Stress regulated members of the plant organic cation transporter family are localized to the vacuolar membrane. *BMC Res. notes.* **1**, 01–10 (2008).

Kutscher, F. Über liebig's fleischextrakt. *Zeitschr. f. Untersuchung.* 582–84 (1905).

L

Lelandais-Brière, C., Jovanovic, M., Torres, G. A. M., Perrin, Y., Lemoine, R., Corre-Menguy, F. & Hartmann, C. Disruption of *AtOCT1*, an organic cation transporter gene, affects root development and carnitine-related responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* **51**, 154–64 (2007).

Li, M., Welti, R. & Wang, X. Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of phospholipases D ζ 1 and D ζ 2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants. *Plant Physiol.* **142**, 750–61 (2006).

Li-Beisson, Y. et al. Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book* **11**, 01–65 (2010).

Lightner, J., Wu, J. & Browse, J. A mutant of *Arabidopsis* with increased levels of stearic acid. *Plant Physiol.* **106**, 1443–51 (1994).

Lin, M. & Oliver, D. J. The role of acetyl-coenzyme A synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **147**, 1822–29 (2008).

Lopez-Bucio, J., Herna, E., Sa, L., Nieto-jacobo, F., Simpson, J. & Herrera-estrella, L. Phosphate Availability Alters Architecture and Causes Changes in Hormone Sensitivity in the *Arabidopsis*. **129**, 01–13 (2002).

Louvet, R., Cavel, E., Gutierrez, L., Guenin, S., Roger, D., Gillet, F., Guerineau, F. & Pelloux, J. Comprehensive expression profiling of the pectin methylesterase gene family during silique development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* **224**, 782–91 (2006).

Lucas, K. A., Filley, J. R., Erb, J. M., Graybill, E. R. & Hawes, J. W. Peroxisomal metabolism of propionic acid and isobutyric acid in plants. *J. Biol. Chem.* **282**, 24980–89 (2007).

M

Mackinney, G. Absorption of light by Chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.* **140**, 315–22 (1941).

Maeda, Y., Ito, T., Suzuki, A., Kurono, Y., Ueta, A., Yokoi, K., Sumi, S., Togari, H. & Sugiyama, N. Simultaneous quantification of acylcarnitine isomers containing dicarboxylic acylcarnitines in human serum and urine by high-performance liquid chromatography / electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **21**, 799–806 (2007).

Manoli, I., De Martino, M. U., Kino, T. & Alesci, S. Modulatory effects of L-carnitine on glucocorticoid receptor activity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1033**, 147–57 (2004).

Markham, J. E., Lynch, D. V., Napier, J. a, Dunn, T. M. & Cahoon, E. B. Plant sphingolipids: function follows form. *Curr. Opin. Plant Biol.* **16**, 350–57 (2013).

Marquis, N. R. & Fritz, I. B. Enzymological determination of free carnitine concentrations in rat tissues. *J. Lipid Res.* **5**, 184–87 (1964).

Martin, T., Oswald, O. & Graham, I. A. Arabidopsis Seedling Growth , Storage Lipid Mobilization , and Photosynthetic Gene Expression Are Regulated by Carbon : Nitrogen Availability 1. **128**, 472–81 (2002).

Masterson, C. & Wood, C. Mitochondrial β -oxidation of fatty acids in higher plants. *Physiol. Plant.* **109**, 217–24 (2000-1).

Masterson, C. & Wood, C. Carnitine palmitoyltransferases in pea leaf chloroplasts : partial purification, location, and properties. *Can. J. Bot.* **335**, 328–35 (2000-2).

Masterson, C. & Wood, C. Influence of mitochondrial β -oxidation on early pea seedling development. *New Phytol.* **181**, 832–42 (2009).

McGarry, J. D., Leatherman, G. F. & Foster, D. W. Carnitine palmitoyltransferase I. The site of inhibition of hepatic fatty acid oxidation by malonyl-CoA. *J. Biol. Chem.* **253**, 4128–36 (1978).

Mclaren, I., Wood, C., Jalil, M. N. H., Yong, B. C. S. & Thomas, D. R. Carnitine acyltransferases in chloroplasts. *Planta.* **163**, 197–200 (1985).

McNeil, P. H. & Thomas, D. R. The effect of carnitine on palmitate oxidation by pea cotyledon mitochondria. *J. Exp. Bot.* **27**, 1163–80 (1978).

Miernyk, J. A. & Trelease, R. N. Control of enzyme activities in cotton cotyledons during maturation and germination. *Plant Physiol.* **67**, 341–46 (1981).

Miller, J. H., Poston, P. A. & Karnes, H. T. A quantitative method for acylcarnitines and amino acids using high resolution chromatography and tandem mass spectrometry in newborn screening dried blood spot analysis. *J. Chromatogr. B.* **903**, 142–49 (2012).

Minkler, P. E. & Hoppel, C. L. Quantification of free carnitine, individual short- and medium-chain acylcarnitines, and total carnitine in plasma by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **212**, 510–18 (1993).

Missihoun Tagnon, D., Schmitz, J., Klug, R., Kirch, H. H. & Bartels, D. Betaine aldehyde dehydrogenase genes from *Arabidopsis* with different sub-cellular localization affect stress responses. *Planta.* **233**, 369–82 (2011).

Moreno-Pérez, J. A., Venegas-Caleron, M., Vaistij, E. F., Salas, J. J., Larson, R. T., Garcis, R., Graham, I. A. & Martinez-Force, E. Reduced expression of FatA thioesterases in *Arabidopsis* affects the oil content and fatty acid composition of the seeds. *Planta.* **235**, 629–39 (2012).

Mutomba, M. C., Yuan, H., Konyavko, M., Adachi, S., Yokoyama, C. B., Esser, V., McGarry, J. D., Babior, B. M. & Gottlieb, R. A. Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and palmitoylcarnitine. *FEBS Lett.* **478**, 19–25 (2000).

N

Nacry, P., Canivenc, G., Muller, B., Azmi, A., Onckelen, H. V., Nacry, P., Rossignol, M. & Dumas, P. A Role for Auxin Redistribution in the Responses of the Root System Architecture to Phosphate Starvation in *Arabidopsis* 1. **138**, 2061–74 (2005).

Nakamura, Y. Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. *Prog. Lipid Res.* **52**, 43–50 (2013).

Nalecz, K. A., Szczepankowska, D., Czeredys, M., Kulikova, N. & Grześkiewicz, S. Palmitoylcarnitine regulates estrification of lipids and promotes palmitoylation of GAP-43. *FEBS Lett.* **581**, 3950–54 (2007).

Nameth, B., Dinka, S. J., Chatfield, S. P., Morris, A., English, J., Lewis, D., Oro, R. & Raizada, M. N. The shoot regeneration capacity of excised *Arabidopsis* cotyledons is established during the initial hours after injury and is modulated by a complex genetic network of light signalling. *Plant. Cell Environ.* **36**, 68–86 (2013).

Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshida, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **461**, 205–10 (1999).

Napier, J. A., Stobart, A. K. & Shewry, P. R. The structure and biogenesis of plant oil bodies: the role of the ER membrane and the oleosin class of proteins. *Plant Mol. Biol.* **31**, 945–56 (1996).

Napier, J. A. The production of unusual fatty acids in transgenic plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 295–319 (2007).

Nebbioso, M., Evangelista, M., Librando, A., Plateroti, A. M. & Pescosolido, N. Iatrogenic dry eye disease: an eleidoisin/carnitine and osmolyte drops study. *Biomed. Pharmacother.* **67**, 659–63 (2013).

Nerlich, A., von Orlow, M., Rontein, D., Hanson, A. D. & Dörmann, P. Deficiency in phosphatidylserine decarboxylase activity in the *psd1 psd2 psd3* triple mutant of *Arabidopsis* affects phosphatidylethanolamine accumulation in mitochondria. *Plant Physiol.* **144**, 904–14 (2007).

O, P & Q

Ohlrogge, J. B. Design of new plant products: engineering of fatty acid metabolism. *Plant Physiol.* **104**, 821–26 (1994).

Ohlrogge, J. B. & Browse, J. Lipid biosynthesis. *The Plant cell.* **7**, 957–70 (1995).

Ohnishi, S., Okamura, N., Sakamoto, S., Hasegawa, H., Norikura, R., Kanaoka, E., Takahashi, K., Horie, K., Sakamoto, K. & Baba, T. 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 Metab. Pharmacokinet.* **23**, 293–303 (2008).

Paik, W.K. & Kim, S. Protein methylation. *Science.* **174**, 114–19 (1971).

Panter, R. A. & Mudd, J. B. Carnitine levels in some higher plants. *FEBS Lett.* **5**, 169–170 (1969).

Panter, R. A & Mudd, J. B. Some aspects of carnitine metabolism in avocado (*Persea americana*). *Biochem. J.* **134**, 655–58 (1973).

Park, E.-J., Jeknić, Z., Sakamoto, A., DeNoma, J., Yuwansiri, R., Murata, N. & Chen, T. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage. *Plant J.* **40**, 474–87 (2004).

Peluso, G., Barbarisi, A., Savica, V., Reda, E., Nicolai, R., Benatti, P. & Calvani, M. Carnitine: an osmolyte that plays a metabolic role. *J. Cell. Biochem.* **80**, 01–10 (2000).

Péret, B., Clément, M., Nussaume, L. & Desnos, T. Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends Plant Sci.* **16**, (2011).

Petricka, J. J., Winter, C. M. & Benfey, P. N. Control of *Arabidopsis* Root Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* **63**, 563–590 (2012).

Pochini, L., Oppedisano, F. & Indiveri, C. Reconstitution into liposomes and functional characterization of the carnitine transporter from renal cell plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **1661**, 78–86 (2004).

Pracharoenwattana, I., Cornah, J. E. & Smith, S. M. Arabidopsis peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination. *The Plant Cell*. **17**, 2037–48 (2005).

Price, N. T., van der Leij, F. R., Jackson, V. N., Corstorphine, C. G., Thomson, R., Sorensen, A. & Zammit, V. A. A novel brain-expressed protein related to carnitine palmitoyltransferase I. *Genomics*. **80**, 433–42 (2002).

Quettier, A.L. & Eastmond, P. J. Storage oil hydrolysis during early seedling growth. *Plant Physiol. Biochem.* **47**, 485–90 (2009).

Qiao, M., Zhao, Z., Song, Y., Liu, Z., Cao, L., Yu, Y., Li, S. & Xiang, F. Proper regeneration from in vitro cultured Arabidopsis thaliana requires the microRNA-directed action of an auxin response factor. *Plant J.* **71**, 14–22 (2012).

R

Ramsay, R. R., Gandour, R. D. & van der Leij, F. R. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim. Biophys. Acta*. **1546**, 21–43 (2001).

Ramsay, R. R. & Zammit, V. A. Carnitine acyltransferases and their influence on CoA pools in health and disease. *Mol. Aspects Med.* **25**, 475–93 (2004).

Reymond, M., Svistoonoff, S., Loudet, O., Nussaume, L. & Desnos, T. Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in Arabidopsis thaliana. *Plant. Cell Environ.* **29**, 115–25 (2006).

Rea, P. A. Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**, 347–75 (2007).

Rippa, S., Zhao, Y., Merlier, F., Charrier, A. & Perrin, Y. The carnitine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana* shares similar features with the pathway of mammals and fungi. *Plant Physiol. Biochem.* **60**, 109–14 (2012).

Roermund, C. W. T. Van, Elgersma, Y., Singh, N., Wanders, R. J. A. & Tabak, H. F. The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *EMBO J.* **14**, 3480–86 (1995).

Roughan, P. G. & Ohlrogge, J. B. Evidence that isolated chloroplasts contain an integrated lipid-synthesizing assembly that channels acetate into long-chain fatty acids. *Plant Physiol.* **110**, 1239–47 (1996).

Roycewicz, P. & Malamy, J. E. Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on Arabidopsis root and shoot system growth in laboratory assays. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **367**, 1489–500 (2012).

Ruuska, S. A., Schwender, J. & Ohlrogge, J. B. The capacity of green oilseeds to utilize photosynthesis to drive biosynthetic processes. *Plant Physiol.* **136**, 2700–09 (2004).

Rylott, E. L., Gilday, A. D. & Graham, I. A. Carboxykinase in arabidopsis is essential for seedling establishment. **131**, 1834–42 (2003).

S

Salas, J. J. & Ohlrogge, J. B. Characterization of substrate specificity of plant FatA and FatB acyl-ACP thioesterases. *Arch. Biochem. Biophys.* **403**, 25–34 (2002).

Sánchez-Calderón, L., López-Bucio, J., Chacón-López, A., Cruz-Ramírez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J. G. & Herrera-Estrella, L. Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **46**, 174–84 (2005).

Schlame, M. & Ren, M. The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1788**, 2080–83 (2009).

Schnurr, J. A., Shockey, J. M., Boer, G. D & Browse, J. A. Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-Coenzyme A synthetase from *Arabidopsis* 1. *Plant Physiol.* **129**, 1700–09 (2002).

Schwabedisse-Gerbling, H. & Gerhardt, B. Purification and characterization of carnitine acyltransferase from higher plant mitochondria. *Phytochemistry.* **39**, 39–43 (1995).

Servillo, L., Giovane, A., Cautela, D., Castaldo, D. & Balestrieri, M. L. Where does N(ε)-trimethyllysine for the carnitine biosynthesis in mammals come from? *PLoS One.* **9**, e84589 (2014).

Shi, Y., An, L., Li, X., Huang, C. & Chen, G. The octadecanoid signaling pathway participates in the chilling-induced transcription of ω -3 fatty acid desaturases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Biochem.* **49**, 208–15 (2011).

Silva-Adaya, D., Pérez-De La Cruz, V., Herrera-Mundo, M. N., Mendoza-Macedo, Ka., Villeda-Hernández, J., Binienda, Z., Ali, S. F. & Santamaría, A. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *J. Neurochem.* **105**, 677–89 (2008).

Sobiesiak-Mirska, J., Nalecz, M. J. & Nalecz, K. A. Interaction of palmitoylcarnitine with protein kinase C in neuroblastoma NB-2a cells. *Neurochem. Int.* **42**, 45–55 (2003).

Solymosi, K. & Schoefs, B. Etioplast and etio-chloroplast formation under natural conditions: the dark side of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. *Photosynth. Res.* **105**, 143–66 (2010).

Somerville, C. & Browse, J. Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes. *Science*. **252**, 80–87 (1991).

Sowell, J., Fuqua, M. & Wood, T. Quantification of total and free carnitine in human plasma by hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.* **49**, 463–68 (2011).

Sperling, U., Franck, F., van Cleve, B., Frick, G., Apel, K. & Armstrong, G. A. Etioplast differentiation in *Arabidopsis*: both PORA and PORB restore the prolamellar body and photoactive protochlorophyllide-F655 to the cop1 photomorphogenic mutant. *Plant Cell* **10**, 283–96 (1998).

Staehelin, L. A. The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.* **11**, 1151–65 (1997).

Stephens, F. B., Constantin-Teodosiu, D. & Greenhaff, P. L. New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J. Physiol.* **581**, 431–44 (2007).

Steponkus, P. L., Uemura, M., Joseph, R. A. Gilmour, S. J. & Thomashow, M. F. Mode of action of the *COR15a* gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14570–75 (1998).

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. Identification and characterization of a complete carnitine biosynthesis pathway in *Candida albicans*. *FASEB J.* **23**, 2349–59 (2009).

Strijbis, K., van Roermund, C. W., van den Burg, J., van den Berg, M., Hardy, G. P. M., Wanders, R. J. & Distel, B. Contributions of carnitine acetyltransferases to intracellular acetyl unit transport in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* **285**, 24335–46 (2010).

T

Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **29**, 417–26 (2002).

Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J. I., Yabuuchi, H., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y. & Tsuji, A. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J. Biol. Chem.* **273**, 20378–82 (1998).

Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J. I., Sai, Y., Kobayashi, D., Oku, A., Shimane, M. & Tsuji, A. Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. *J. Biol. Chem.* **275**, 40064–72 (2000).

Tein, I., Bukovac, S. W. & Xie, Z. W. Characterization of the human plasmalemmal carnitine transporter in cultured skin fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **329**, 145–55 (1996).

Theodoulou, F. L. *et al.* Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiol.* **137**, 835–40 (2005).

Thomas, D. R., Araffin, A., Jalil, M. N. H., Yong, B. C. S., Cooke, R. J. & Wood, C. Effect of carnitine on greening barley leaves. *Phytochemistry*. **20**, 1241–44 (1981).

Thomas, D. R., Noh Hj Jalil, M., Ariffin, A., Cooke, R. J., McLaren, I., Yong, B. C. S. & Clifford, W. The synthesis of short- and long-chain acylcarnitine by etio-chloroplasts of greening barley leaves. *Planta*. **158**, 259–63 (1983).

Thomas, D. R. & Wood, C. The two β -oxidation sites in pea cotyledons. *Planta*. **168**, 261–66 (1986).

Tjellström, H., Yang, Z., Allen, D. K. & Ohlrogge, J. B. Rapid kinetic labeling of Arabidopsis cell suspension cultures: implications for models of lipid export from plastids. *Plant Physiol.* **158**, 601–11 (2012).

Tomita, M. & Senju, Y. Über die aminoverbindungen, welche die biuretreaktion zeigen. III. Spaltungen der γ -amino- β -oxybuttersäure in die optisch aktiven komponenten. *Physiol. Chem.* **169**, 163–77 (1927).

Turnham, E. & Northcote, D. H. Changes in the activity of acetyl-CoA carboxylase during rape-seed formation. *Biochem. J.* **212**, 223–29 (1983).

Tylichová, M., Kopečný, D., Moréra, S., Briozzo, P., Lenobel, R., Snégaroff, J. & Sebel, M. Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *Pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes. *J. Mol. Biol.* **396**, 870–82 (2010).

U & V

Upchurch, R. G. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol. Lett.* **30**, 967–77 (2008).

Van Bocxlaer, J. F. & De Leenheer, A. P. Solid-phase extraction technique for gas-chromatographic profiling of acylcarnitines. *Clin. Chem.* **39**, 1911–17 (1993).

van Roermund, C. W., Hettema, E. H., van den Berg, M., Tabak, H. F. & Wanders, R. J. 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 J.* **18**, 5843–52 (1999).

van Roermund, C. W., Visser, W. F., Ijlst, L., Waterham, H. R. & Wanders, R. J. Differential substrate specificities of human ABCD1 and ABCD2 in peroxisomal fatty acid β -oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **1811**, 148–52 (2011).

van Vlies, N., Tian, L., Overmars, H., Bootsma, A. H., Kulik, W., Wanders, R. J. A., Wood, P. A. & Vaz, F. M. Characterization of carnitine and fatty acid metabolism in the long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mouse. *Biochem. J.* **387**, 185–93 (2005).

van Vlies, N., Ruiter, J. P. N., Doolaard, M., Wanders, R. J. A. & Vaz, F. M. An improved enzyme assay for carnitine palmitoyl transferase I in fibroblasts using tandem mass spectrometry. *Mol. Genet. Metab.* **90**, 24–29 (2007).

Vaz, F. M. & Wanders, R. J. A. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem. J.* **361**, 417–29 (2002).

Ventura, F. V., Ijlst, L., Ruiter, J., Ofman, R., Costa, C. G., Jakobs, C., Duran, M., Tavares de Almeida, I., Bieber, L. L. & Wanders, R. J. Carnitine palmitoyltransferase II specificity towards β -oxidation intermediates. Evidence for a reverse carnitine cycle in mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **253**, 614–18 (1998).

Vernez, L., Wenk, M. & Krahenbuhl, S. Determination of carnitine and acylcarnitines in urine by high-performance liquid chromatography – electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **984**, 203–13 (2003).

Violante, S., Ijlst, L., Te Brinke, H., Koster, J., Tavares de Almeida, I., Wanders, R., Ventura, F. & Houten, S. Peroxisomes contribute to the acyl-carnitine production when the carnitine shuttle is deficient. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 1467–74 (2013).

Vrkoslav, V. & Cvačka, J. Identification of the double-bond position in fatty acid methyl esters by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1259**, 244–50 (2012).

W

Wallis, J. G. & Browse, J. Mutants of Arabidopsis reveal many roles for membrane lipids. *Prog. Lipid Res.* **41**, 254–78 (2002).

Wanders, R. J., Vreken, P., Ferdinandusse, S., Jansen, G. A., Waterham, H. R., van Roermund, C. W. & Van Grunsven, E. G. Peroxisomal fatty acid α - and β -oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 250–67 (2001).

Wang, Z., Xu, C. & Benning, C. TGD4 involved in endoplasmic reticulum-to-chloroplast lipid trafficking is a phosphatidic acid binding protein. *Plant J.* **70**, 614–23 (2012).

Warren, C. R. Quaternary ammonium compounds can be abundant in some soils and are taken up as intact molecules by plants. *New Phytol.* **198**, 476–85 (2013).

Washington, L., Cook, G. A & Mansbach, C. M. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase in the rat small intestine reduces export of triacylglycerol into the lymph. *J. Lipid Res.* **44**, 1395–403 (2003).

Westphal, S., Heins, L., Soll, J. & Vothknecht, U. C. *Vipp1* deletion mutant of *Synechocystis*: a connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4243–48 (2001a).

Westphal, S., Soll, J. & Vothknecht, U. C. A vesicle transport system inside chloroplasts. *FEBS Lett.* **506**, 257–61 (2001b).

Woeltje, K., Esser, V., Weis, B C., Cox, W F., Schroeder, J G., Liao, S T., Foster, D W., Weis, B C., Liao, T., Foster, W. & Ejn, J. D. M. Inter-tissue and Inter-species Carnitine Palmitoyltransferase Characteristics of the Mitochondrial Enzyme System. *J. Biol. Chem.* **265**, 10714–19 (1990).

Wolf, G. The discovery of a vitamin role for carnitine: The first 50 years. *J. Nutr.* **136**, 2131–34 (2006).

Woo, J., MacPherson, C. R., Liu, J., Wang, H., Kiba, T., Hannah, M. A., Wang, X. - J., Bajic, V. B. & Chua, N. -H. The response and recovery of the *Arabidopsis thaliana* transcriptome to phosphate starvation. *BMC Plant Biol.* **12**, 01–22 (2012).

Wood, C., Jalil, M. N. H., McLaren, I., Yong, B. C. S., Ariffin, A., McNeil, P. H., Burgess, N. & Thomas, D. R. Carnitine long-chain acyltransferase and oxidation of palmitate, palmitoyl coenzyme A and palmitoylcarnitine by pea mitochondria preparations. *Planta.* **161**, 255–60 (1984).

Wu, X.-L., Liu, Z.-H., Hu, Z.-H. & Huang, R.-Z. BnWRI1 coordinates fatty acid biosynthesis and photosynthesis pathways during oil accumulation in rapeseed. *J. Integr. Plant Biol.* XXXX, (2014).

Wu, Y., Li, R. & Hildebrand, D. F. Biosynthesis and metabolic engineering of palmitoleate production, an important contributor to human health and sustainable industry. *Prog. Lipid Res.* **51**, 340–49 (2012).

X, Y & Z

Xu, C., Yu, B., Cornish, A. J., Froehlich, J. E. & Benning, C. Phosphatidylglycerol biosynthesis in chloroplasts of *Arabidopsis* mutants deficient in acyl-ACP glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Plant J.* **47**, 296–309 (2006).

Xu, C., Fan, J., Cornish, A. J. & Benning, C. Lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in *Arabidopsis* requires the extraplastidic TGD4 protein. *The Plant Cell.* **20**, 2190–2204 (2008).

Yang, Z. & Ohlrogge, J. B. Turnover of fatty acids during natural senescence of *Arabidopsis*, *Brachypodium*, and switchgrass and in *Arabidopsis* β -oxidation mutants. *Plant Physiol.* **150**, 1981–89 (2009).

Yazdanbakhsh, N. & Fisahn, J. Analysis of *Arabidopsis thaliana* root growth kinetics with high temporal and spatial resolution. *Ann. Bot.* **105**, 783–91 (2010).

Yu, B. & Benning, C. Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in *Arabidopsis*. *Plant J.* **36**, 762–70 (2003).

Zammit, V. A., Ramsay, R. R., Bonomini, M. & Arduini, A. Carnitine, mitochondrial function and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 1353–62 (2009).

Zarka, D. G., Vogel, J. T., Cook, D. & Thomashow, M. F. Cold induction of *Arabidopsis* *CBF* genes involves multiple ICE (inducer of *CBF* expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Mol. Biol.* **133**, 910–18 (2003).

Zhang, M., Fan, J., Taylor, D. C. & Ohlrogge, J. B. DGAT1 and PDAT1 acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development. *Plant Cell.* **21**, 3885–3901 (2009).

Zuniga, A. & Li, L. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for comprehensive analysis of urinary acylcarnitines. *Anal. Chim. Acta.* **689**, 77–84 (2011).

ANNEXES

Annexe 1

Les différents milieux préparés ont une base commune en micro-éléments et une composition modifiée en macro-éléments. Avant d'autoclaver les milieux, 8 g/L d'agar agar sont ajoutés.

Base commune	Produit	Concentration (mM)	MM (g/mol)	Volume final (L)	Masse à prélever (mg)
Micro-éléments	KI	0,005	166	1	0,830
	H ₃ BO ₃	0,100	61,83	1	6,200
	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,100	169,01	1	16,900
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,030	287,58	1	8,600
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,00103	241,95	1	0,250
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,000100	249,68	1	0,025
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,100	278,01	1	27,800
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,100	372,24	1	37,260
Milieu MS + Pi (1000 µM)	Produit	Concentration (mM)	MM (g/mol)	Volume final (L)	Masse à prélever (mg)
Macro-éléments	NH ₄ , NO ₃	20,61	80,052	1	1650
	KNO ₃	18,79	101,1	1	1900
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	3,00	147,01	1	441
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,50	246,47	1	370
	KH ₂ PO ₄	1,00	136,09	1	136
Milieu MS - Pi (1 µM)	sucrose				5000
	NH ₄ , NO ₃	20,61	80,052	1	1650
	KNO ₃	18,79	101,1	1	1900
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	3,00	147,01	1	441
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,50	246,47	1	370
Macro-éléments	KH ₂ PO ₄	0,0010	136,09	1	0,136
	KCl	1,00			
	sucrose				5000
Milieu abolissant l'utilisation des TAG	Produit	Concentration (mM)	MM (g/mol)	Volume final (L)	Masse à prélever (mg)
Macro-éléments	NH ₄ , NO ₃	0,03	80,052	1	3
	KNO ₃	0,03	101,1	1	3
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	3,00	147,01	1	441
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,50	246,47	1	370
	KH ₂ PO ₄	1,00	136,09	1	136
Macro-éléments	KCl	18,78	74,55	1	1400
	sucrose				34200

Annexe 2

Post-germination : expérience 2

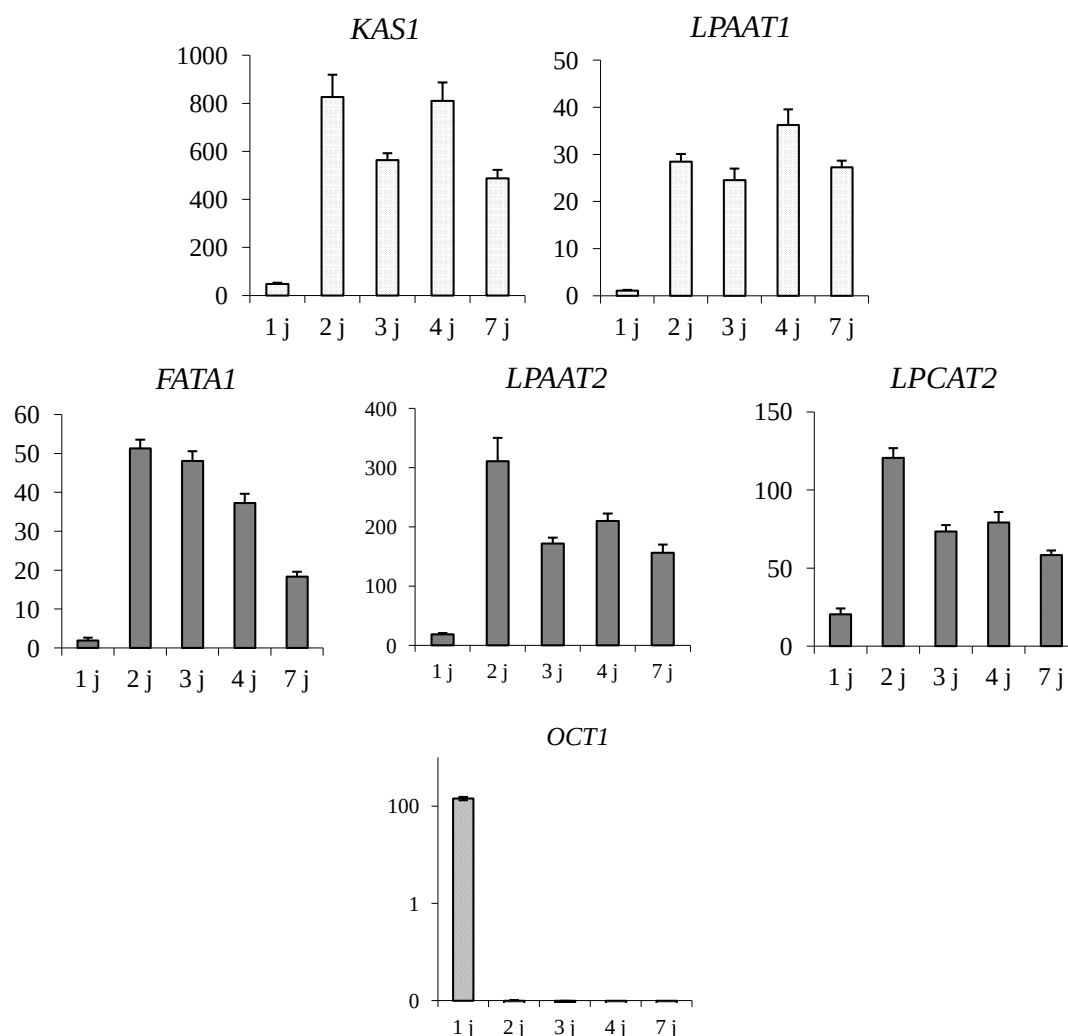


Figure Evolution de l'expression de gènes marqueurs des synthèses lipidiques au cours du développement post-germinatif de plantules d'*Arabidopsis* (écotype WS) cultivées *in vitro* sur milieu M&S, entre 1 j et 7 j de développement post-imbibition. La quantification de l'expression a été réalisée par PCR quantitative en temps réel et les valeurs sont relatives à l'expression du gène de référence At4g33380. Abréviations : *KAS I*, gène de la ketoacyl-ACP synthase I ; *FATA1*, gène de l'acyl-ACP thioesterase A isoforme 1 ; *LPAAT1* et *LPAAT2*, gènes des lysophosphatidic acid acyl-transférases 1 et 2 respectivement ; *LPCAT2*, gène de la lysophosphatidylcholine acyl-transférase 2 ; *AtOCT1*, gène de l'organic cation transporter 1.

Annexe 3

Post-germination 2 j : *fatb* vs WS

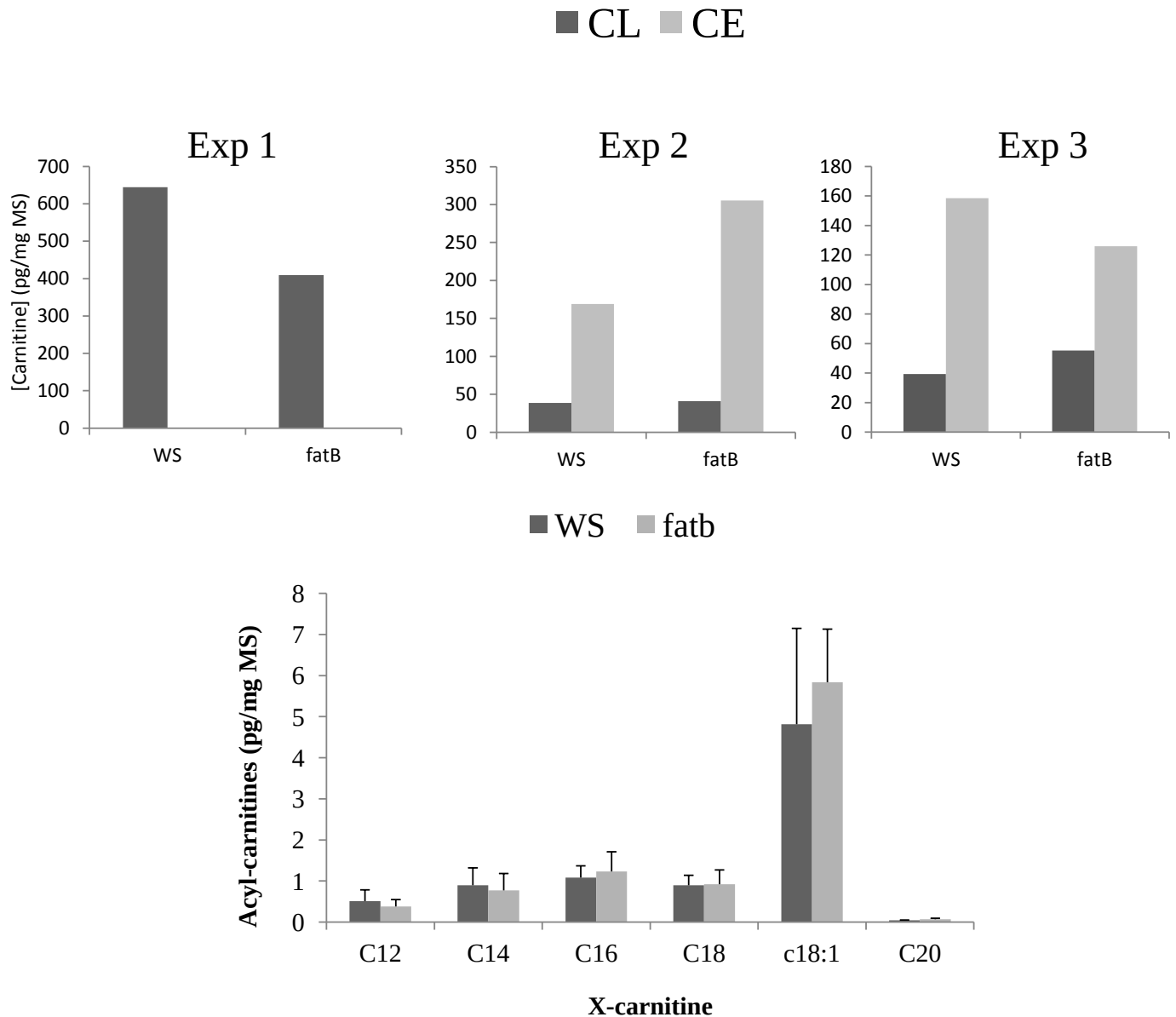


Figure Teneur en carnitine libre (CL) et estérifiée (CE) dans le mutant *fatb* par rapport à son écotype WS à 2 j développement post-imbibition sur milieu M&S. **(B)** Teneur spécifique de chaque acyl-carnitine dosée dans le mutant *fatb* par rapport à son écotype WS. Les valeurs sont exprimées en pg/mg de matière sèche et représentent la moyenne $\pm$ écart-type des résultats de trois expérimentations biologiquement indépendantes.

Annexe 4

Organogénèse : expérience 2

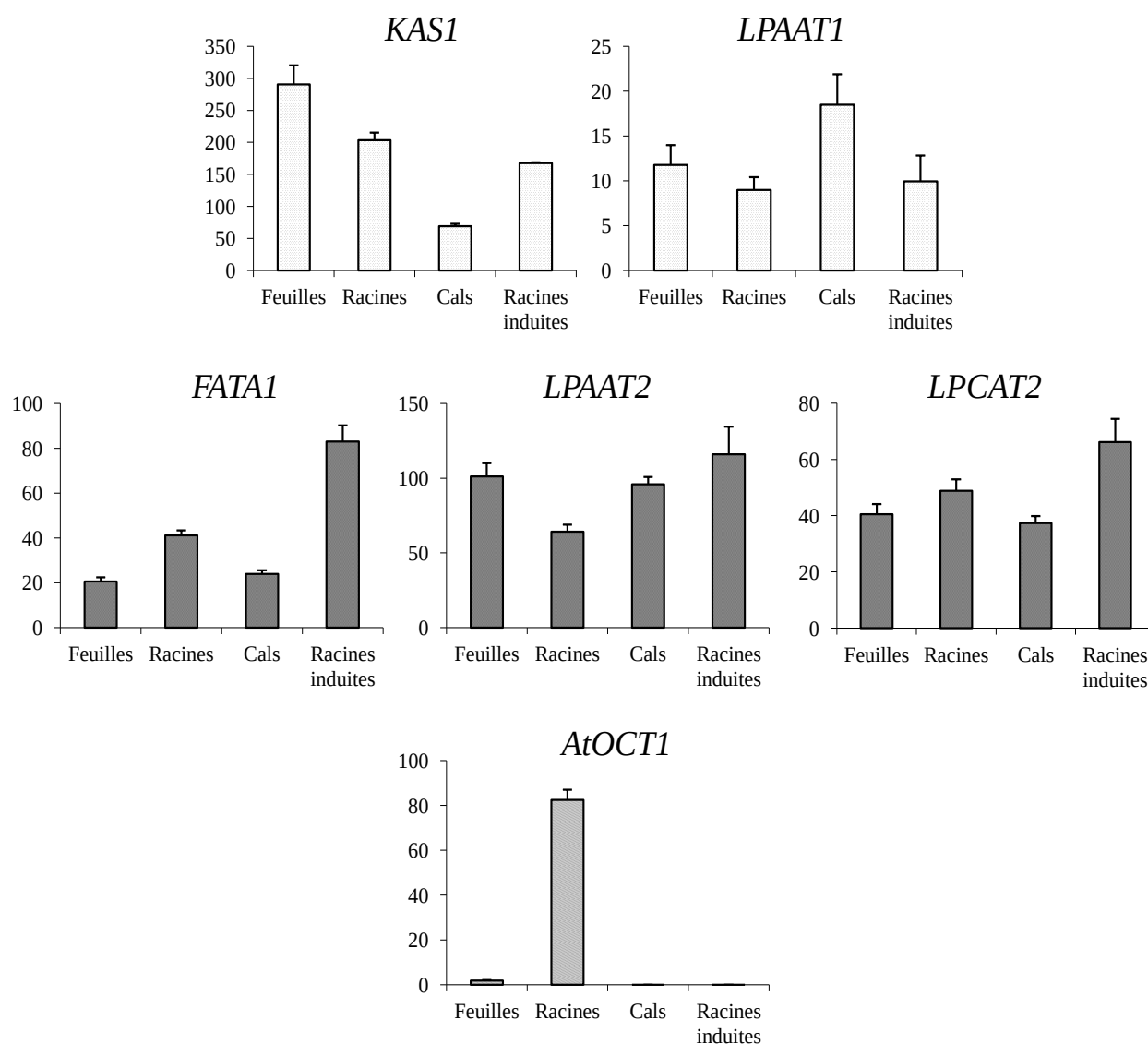


Figure Expression de gènes marqueurs des synthèses lipidiques dans des feuilles et des racines de plantules d'Arabidopsis (écotype WS) à 11 j de développement sur milieu M&S et dans des cals d'Arabidopsis (écotype WS) avant induction racinaire et des racines induites sur les cals. La quantification de l'expression a été réalisée par PCR quantitative en temps réel et les valeurs sont relatives à l'expression du gène de référence At4g33380. Abréviations : ***KAS I***, gène de la ketoacyl-ACP synthase I ; ***FATA1***, gène de l'acyl-ACP thioesterase A isoforme 1 ; ***LPAAT1*** et ***LPAAT2***, gènes des lysophosphatidic acid acyltransférases 1 et 2 respectivement ; ***LPCAT2***, gène de la lysophosphatidylcholine acyl-transférase 2 ; ***AtOCT1***, gène de l'organic cation transporter 1.

Annexe 5

Stress Froid expérience 2

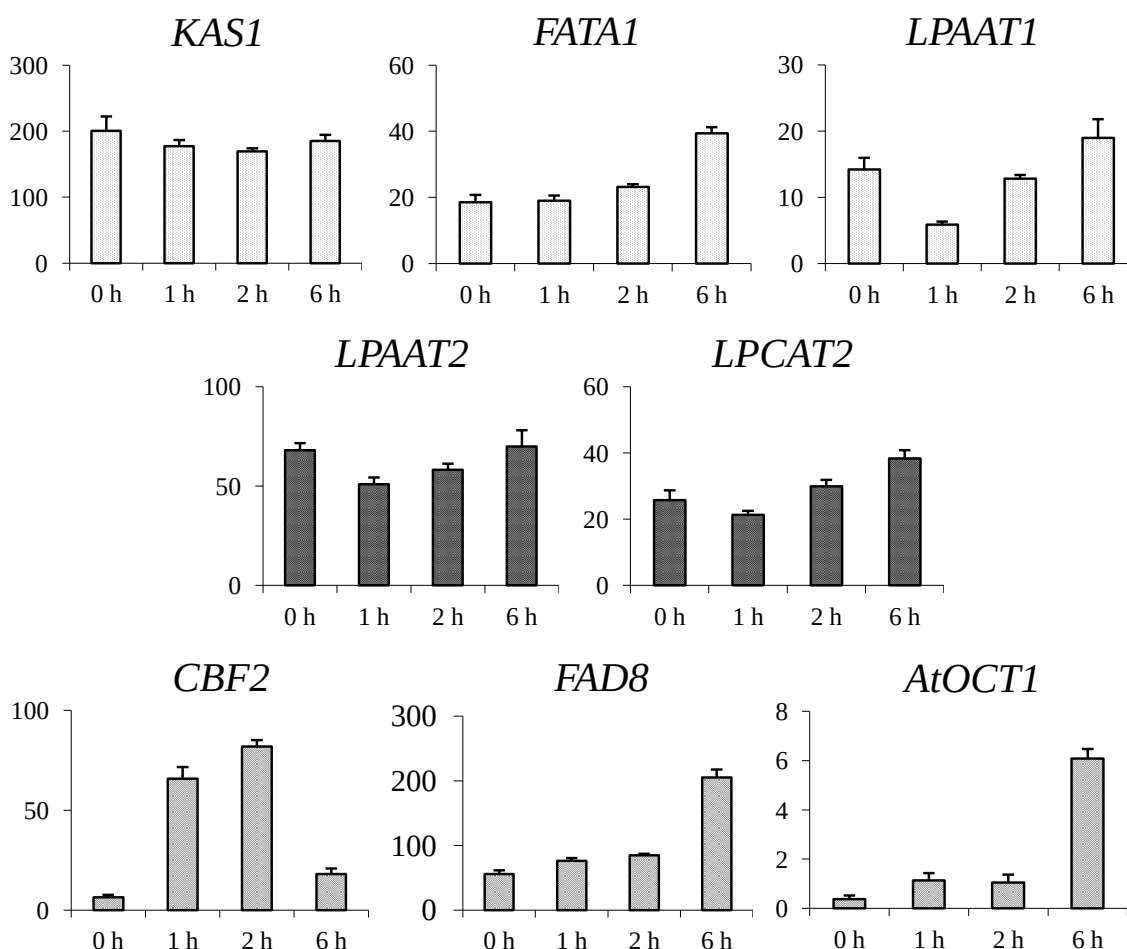


Figure Evolution de l'expression de gènes marqueurs des synthèses lipidiques et de réponse précoce au froid de plantules d'*Arabidopsis* (écotype WS) cultivées pendant 14 j à 24°C et transférées dans un phytotron réfrigéré à 7°C, pendant 0, 1, 2 et 6 h. La quantification de l'expression a été réalisée par PCR quantitative en temps réel et les valeurs sont relatives à l'expression du gène de référence *CLATHRIN* (At5g46630). Abréviations : ***KAS I***, gène de la ketoacyl-ACP synthase I ; ***FATA1***, gène de l'acyl-ACP thioesterase A isoforme 1 ; ***LPAAT1*** et ***LPAAT2*** gène de la lysophosphatidic acid acyl-transférase 1 et 2 ; ***LPCAT2***, gène de la lysophosphatidylcholine acyl-transférase 2 ; ***CBF2***, gène de la *C-REPEAT/DRE BINDING FACTOR 2* ; ***FAD8***, gène de la fatty acid desaturase 8 ; ***AtOCT1***, gène de l'organic cation transporter 1.

Annexe 6

Stress Froid expérience 3

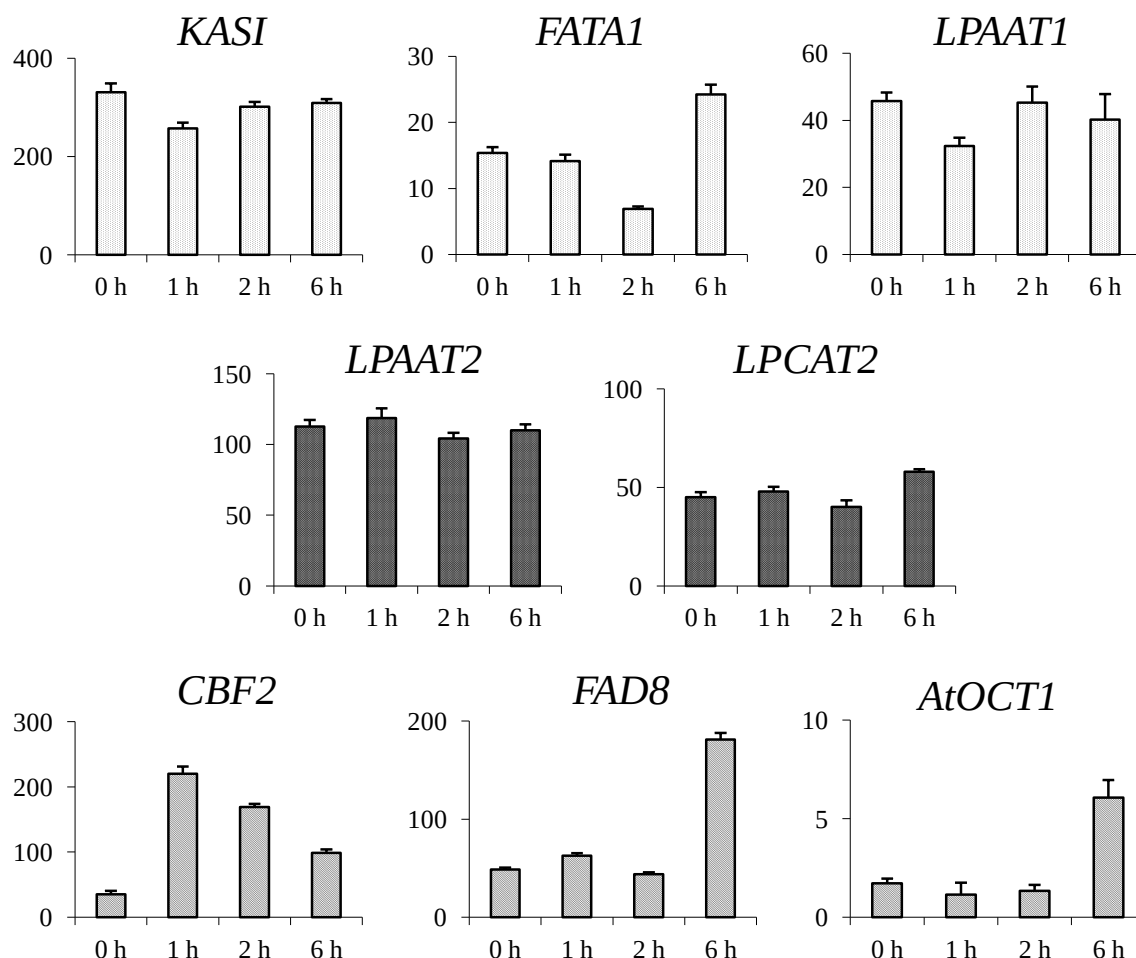


Figure Evolution de l'expression de gènes marqueurs des synthèses lipidiques et de réponse précoce au froid de plantules d'*Arabidopsis* (écotype WS) cultivées pendant 14 j à 24°C et transférées dans un phytotron réfrigéré à 7°C, pendant 0, 1, 2 et 6 h. La quantification de l'expression a été réalisée par PCR quantitative en temps réel et les valeurs sont relatives à l'expression du gène de référence *CLATHRIN* (At5g46630). Abréviations : *KAS I*, gène de la ketoacyl-ACP synthase I ; *FATA1*, gène de l'acyl-ACP thioesterase A isoforme 1 ; *LPAAT1* et *LPAAT2* gène de la lysophosphatidic acid acyl-transférase 1 et 2 ; *LPCAT2*, gène de la lysophosphatidylcholine acyl-transférase 2 ; *CBF2*, gène de la *C-REPEAT/DRE BINDING FACTOR 2* ; *FAD8*, gène de la fatty acid desaturase 8 ; *AtOCT1*, gène de l'organic cation transporter 1.

RESUME

La modification des profils spécifiques en acides gras (AG) dans des huiles végétales peut servir à l'amélioration de leur qualité nutritionnelle, mais également à l'émergence d'une industrie biosourcée où les AG peuvent représenter une alternative aux ressources carbonées fossiles. Cependant des difficultés à modifier le profil en AG des huiles végétales, partagées par l'ensemble des équipes de recherche impliquées subsistent. Bien que la biosynthèse des AG est aujourd'hui bien caractérisée chez les plantes, des incertitudes persistent concernant les voies de transfert des AG du pool d'acyl-CoA vers les précurseurs lipidiques, et les formes de transport entre les différents compartiments impliqués dans les synthèses lipidiques. La carnitine est un acteur essentiel du trafic intracellulaire des AG chez l'animal et la levure. La présence avérée chez la plante d'acyl-carnitines au côté de la carnitine libre, et la mise en évidence d'activités enzymatiques associées, prouvent également le lien entre la carnitine et le métabolisme des AG. Le travail de cette thèse a donc porté sur un approfondissement des connaissances sur le rôle de la carnitine dans le métabolisme lipidique chez *Arabidopsis thaliana*. A ce titre, nous avons pu montrer par LC-QQQ-MS/MS dans nos extraits végétaux, que l'oléoyl-, la palmitoyl- et la stéaroyl-carnitine sont les espèces majoritaires et correspondent aux 3 AG (C18:1, C16:0 et C18:0) principalement synthétisés et exportés des plastides, pour alimenter la synthèse lipidique de la voie eucaryotique. De plus, une augmentation significative des teneurs en acyl-carnitines a été mesurée dans des processus développementaux nécessitant une forte synthèse de glycérolipides, tels que le développement post-germinatif (2 j post-imbibition) ou lors de l'organogenèse racinaire, en concomitance avec le niveau d'expression des gènes marqueurs de la synthèse lipidique eucaryotique. D'autre part, la comparaison des teneurs en acyl-carnitines et en carnitine estérifiée a révélé un résultat inédit montrant qu'une grande fraction de la carnitine est estérifiée à des AG inhabituels ou des acides organiques que nous cherchons actuellement à identifier par LC-qTOF-MS/MS. Ainsi, l'ensemble de nos résultats suggèrent que la carnitine pourrait être impliquée dans le trafic intracellulaire d'AG pour la synthèse de lipides eucaryotiques et de lipides particuliers et/ou dans la prise en charge d'acides organiques encore non identifiés dans les plantes.

Mots clés : acide gras, carnitine, acyl-carnitines, métabolisme lipidique, voie eucaryotique

ABSTRACT

Specific modification of fatty acid profiles (FA) in vegetable oils can help to improve their nutritional quality but also to the development of a bio-based industry where FA may represent an alternative to fossil fuel sources. However problems to modify the FA profile of vegetable oils still remain and are shared by all the teams involved. Although the biosynthesis of AG is now well characterized in plants, uncertainties remain about the tranfert of AG of acyl-CoA pool to lipid precursors and the forms of transport between different compartments involved in lipid synthesis. Carnitine plays an essential role in intracellular trafficking of FA in animals and yeast. The known presence of acyl-carnitines in plant alongside the free carnitine, and measurement of associated enzymatic activities also show the link between FA metabolism and carnitine. During this thesis we tried to improve our understanding of the role of carnitine in lipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. We have shown by LC-QQQ-MS / MS in our plant extracts that oleoyl-, palmitoyl- and stearoyl-carnitine are the predominant species and correspond to the three main AG (C18:1, C16:0 and C18:0) synthesized and exported from the plastids to supply the lipid synthesis of the eukaryotic pathway. Moreover, a significant increase of the levels of acyl-carnitines were measured in developmental processes requiring high glycerolipid synthesis, such as the post-germinative growth (2 days post-imbibition) during root organogenesis, concomitantly with the level of expression of the eukaryotic lipid synthesis marker genes. Furthermore, comparison of the levels of acyl-carnitine and carnitine ester revealed an unpublished results showing that a large fraction of carnitine is esterified to unusual FA or organic acids that we are currently identifying by LC QTOF-MS/MS. Thus, all of our results suggest that carnitine could be involved in the intracellular traffic of FA for the synthesis of lipids and particular eukaryotic lipids and/or in the transport of yet unidentified organic acids in plants.

Keywords: fatty acid, carnitine, acyl-carnitine, lipid metabolism, pathway eukaryotic