

Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2009

Thèse n°1630

THESE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biochimie

Par **Lionel FAURE**

Identification et caractérisation de la première N-acylphosphatidyléthanolamine synthase chez *Arabidopsis thaliana*.

Thèse dirigée par : Denis Coulon

Présentée et soutenue publiquement : Le 27 novembre 2009

Membres du jury :

M. HERNOULD	Professeur à l'Université Victor Segalen Bordeaux 2	Président
E. JEANNETTE	Maître de conférence à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris	Rapporteur
JL. MONTILLET	Directeur de recherche au CEA, Cadarache	Rapporteur
T. FERREIRA	Maître de conférence à l'Université de Poitiers	Examineur
JJ. BESSOULE	Directeur de recherche au CNRS à l'Université Victor Segalen Bordeaux 2	Examineur
D. COULON	Maître de conférence à l'ESTBB à l'Université Victor Segalen Bordeaux 2	Directeur de thèse

Remerciements

L'ensemble de ces travaux de recherche a été réalisé au laboratoire de Biogenèse Membranaire – UMR 5200 CNRS- à Bordeaux. Je tiens à remercier Monsieur René LESSIRE pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je remercie les membres du jury : Monsieur Michel HERNOULD d'en avoir accepté la présidence, Madame Emmanuelle JEANNETTE, Monsieur Jean-Luc MONTILLET et Monsieur Thierry FERREIRA pour avoir accepté de juger mon travail.

J'adresse mes remerciements au Conseil Régional d'Aquitaine pour son aide financière durant ces trois années de thèse.

Comment remercier celui qui a toujours été là dans les très bons moments et les moins bons. Celui qui a toujours trouvé les mots pour réinsuffler le courage quand il me faisait défaut, celui qui a accepté de partager son savoir et son temps. Denis merci pour ton altruisme, ta gentillesse, ton impavide bonne humeur, ta patience et tous tes précieux conseils.

Je tiens à remercier chaleureusement Jean-Jacques BESSOULE pour m'avoir accueilli au sein de son équipe « Homéostasie membranaire ». Je lui serai éternellement reconnaissant pour ses conseils et sa patience durant ces trois années de thèse.

Merci également à Jean-Marie SCHMITTER et Xavier SANTARELLI pour leur aide lors de ce travail.

Un immense merci à tous les membres du laboratoire : Agnès, Amélie, Anne-Marie, Auriane, Eric, Fabienne. B, Fransiska, Françoise, Frédo, Frédérique, Jeanny, Jérôme, Myriam, Patrick, Rémi, Sébastien, Sophie, Stéphanie, Su, Sylvain, Sylvette, Valérie, Vincent, Yongua, pour leurs conseils et tous les merveilleux moments passés ensemble.

Merci à Lilly MANETA-PEYRET pour m'avoir permis de réaliser mes premiers pas dans le monde passionnant de l'enseignement.

Un grand merci à Marina et Fabienne deux "anciennes collègues" devenues aujourd'hui deux amies précieuses.

Chouquette, Nanou, MC, Linux, David, et Popo, merci de votre amitié et de votre soutien.

Enfin je dédie ce mémoire à mes parents et mes sœurs ainsi qu'à Loïc et Igor qui m'ont toujours fait confiance, qui ne m'ont jamais jugé sur mes choix, et qui ont toujours été là pour moi, merci de tout cœur.

TABLE DES MATIERES

Lexique	1
Introduction	5
Données bibliographiques	13
1. Distribution des NAE et NAPE dans les cellules eucaryotes	13
1.1 Chez les animaux	13
1.1.1 Distribution des NAPE	13
1.1.2 Distribution des NAE	14
1.2 Chez les plantes	16
1.2.1 Distribution des NAPE	16
1.2.2 Distribution des NAE	17
2. Fonctions des NAPE et des NAE	18
2.1 Fonctions des NAPE chez <i>E. coli</i>	18
2.2 Fonctions des NAPE chez les cellules eucaryotes	19
2.3 Fonctions et effets des NAE	21
2.3.1 Chez les animaux	21
2.3.1.1 Implication des NAE dans la notion de satiété et sur la prise de poids	21
2.3.1.2 Implication des NAE sur le comportement	23
2.3.1.3 Implication des NAE dans les phénomènes de mémorisation	23
2.3.1.4 Implication des NAE dans l'induction du sommeil	23
2.3.1.5 Implication des NAE sur la prolifération cellulaire, l'apoptose et la nécrose	24
2.3.1.6 Implication des NAE et des récepteurs CB1 dans l'implantation de l'embryon chez la souris	25
2.3.1.7 Implication des NAE dans les processus anti-inflammatoires	26
2.3.1.8 NAE et perception de la douleur	26
2.3.2 Chez les plantes	26
2.3.2.1 Activation des réponses courtes et longues de défense des plantes lors d'attaques pathogènes	26
a. Rappels	26
b. Effet du NAE-14:0 dans la mise en place des réponses de défense lors d'attaques pathogènes	27
2.3.2.2 Interactions NAE/Phospholipase D	29
a. Effet sur la fermeture des stomates chez <i>A. thaliana</i>	30
b. Effets sur la germination et le développement des jeunes plantules	31
c. Effet des NAE sur le ralentissement de la chute des fleurs chez <i>Dianthus caryophyllus</i>	33
2.3.2.3 Interactions NAE/acide abscissique dans le développement des plantules d' <i>A. thaliana</i>	34
3 Métabolisme des N-Acyléthanolamines et de leurs précurseurs	35
3.1 Synthèse de NAPE chez les animaux	35
3.1.1 L'activité NAPE-synthase Ca^{2+} dépendante	35
3.1.2 L'activité NAPE-synthase Ca^{2+} indépendante	36
3.2 Synthèse de NAPE chez les plantes	38
3.3 Synthèse des NAE	41
3.3.1 Chez l'animal	41
3.3.1.1 Synthèse de NAE via la voie NAPE-PLD	41
3.3.1.2 Voies alternatives de synthèse des NAE chez les animaux	42
3.3.2 Synthèse de NAE chez les plantes	44
3.4 Dégradation des NAE	45

3.4.1	Chez les animaux <i>via</i> la Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH)	45
3.4.2	Dégradation des NAE chez les plantes	46
3.4.2.1	Identification de la première FAAH d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
3.4.2.2	Dégradation des NAE par la voie des lipoxygénases chez <i>A. thaliana</i>	47
4	Les acyltransférases	49
4.1	Généralités	49
4.2	Caractéristiques des séquences protéiques des acyltransférases impliquées dans le métabolisme lipidique	49
4.2.1	Les acyltransférases à domaine « plsc »	50
4.2.2	Les acyltransférases « MBOAT »	50
4.3	Rôles des acyltransférases dans le métabolisme lipidique	50
4.3.1	Synthèse de <i>nov</i> o des phospholipides <i>via</i> les acyltransférases	50
4.3.2	Remodelage des lipides <i>via</i> les acyltransférases	51
4.3.3	Rôles des acyltransférases dans le transfert des phospholipides entre organites	51
	Matériels et Méthodes	55
1.	Etude Bioinformatique	55
1.1	Alignements multiples de séquences	55
1.2	Edition et mise en forme des alignements multiples	55
1.3	Prédiction des domaines transmembranaires et leur topologie	56
1.4	Recherche de signaux d'adressage et de la localisation intracellulaire	56
2.	Matériels Biologiques	57
2.1	Matériel végétal et conditions de culture	57
2.1.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> ou "l'arabette des dames"	57
2.1.2	Mutants d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et plants de tabac	58
2.1.3	Stérilisation des graines	59
2.1.4	Milieus et conditions de culture	59
2.2	Souches bactériennes et milieux de culture	59
2.3	Plasmides et vecteurs d'expression	61
3.	Méthodes de biologie moléculaire	66
3.1	Extraction des acides nucléiques	66
3.1.1	Extraction des ARN totaux d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
3.1.2	Extraction d'ADN génomique d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
3.1.3	Extraction d'ADN plasmidique chez <i>E. coli</i> et <i>A. tumefaciens</i>	67
3.1.4	Extraction des fragments d'ADN obtenus par PCR ou des produits de digestion	67
3.1.5	Electrophorèse des acides nucléiques	67
3.2	Amplification <i>in vitro</i> de fragments d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)	68
3.3	RT-PCR quantitative	69
3.3.1	Principe	69
3.3.2	Transcription inverse	70
3.3.3	Sélection des amorces utilisées pour la PCR quantitative	70
3.3.4	Mélange réactionnel	71
3.3.5	Cycle de PCR	71
3.3.6	Normalisation des résultats	72
3.4	Clonage dans le vecteur pET-15b	73
3.4.1	Amplification du gène At1g78690	73
3.4.2	Ligation de l'insert dans le plasmide pGEM®-T Easy	73
3.4.3	Transformation de bactéries <i>E. coli</i> par électroporation	74
3.4.4	Criblage des transformants	74
3.4.5	Analyse des clones recombinants par PCR sur colonie	75
3.4.6	Vérification des clones recombinants par PCR	75
3.4.7	Insertion du gène d'intérêt dans le vecteur pET-15b	76
3.4.7.1	Préparation du vecteur pET-15b	76
3.4.7.2	Préparation de l'insert	76
3.4.7.3	Ligation pET-15b::At1g78690 ADNc	76
3.4.7.4	Transformation de bactéries <i>E. coli</i> par choc thermique et sélection de clones contenant le plasmide pET-15b::At1g78690	77
3.5	Clonage <i>via</i> la technologie GATEWAY™	78

3.5.1	Généralités	78
3.5.2	Les amorces	79
3.5.3	Construction du plasmide donneur	79
3.5.4	La réaction BP	80
3.5.5	Transformation des bactéries et sélection des clones transformés par le plasmide pDONR221 TM ::At1g78690	80
3.5.6	La réaction LR	80
3.5.7	Transformation des bactéries et sélection des clones transformés par le plasmide de destination recombiné avec la séquence d'intérêt	81
4.	Méthodes d'analyses des protéines	81
4.1	Dosage des protéines	81
4.2	Electrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	81
4.3	Séquençage des protéines	82
4.4	Analyse par Western Blot	82
4.5	Obtention de l'anticorps anti-At1g78690	83
5.	Méthodes d'analyses des lipides	83
5.1	Extraction des lipides totaux de plantes	83
5.2	Extraction des lipides totaux chez <i>E. coli</i>	83
5.3	Séparation et dosage des lipides	84
5.3.1	Analyse des lipides par chromatographie sur couche mince (CCM)	84
5.3.2	Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG)	85
5.3.3	Analyse des lipides par ESI-MS/MS	85
5.3.4	Quantification des lipides marqués au [¹⁴ C]	86
5.4	Test à la PLD de <i>S.Chromofuscus</i>	86
6.	Méthodes d'études de l'activité NAPE synthase <i>in vitro</i>	86
6.1	Expression de la protéine At1g78690-6HIS	86
6.2	Solubilisation et purification de la protéine recombinante At1g78690-6HIS	87
6.2.1	A l'aide d'un ÄKTAexplorer	87
6.2.2	A l'aide du kit Sepharose 6 Fast Flow TM	87
6.3	Etude <i>in vitro</i> de l'activité NAPE-synthase de la protéine At1g78690-6HIS	88
6.4	Préparation des membranes d' <i>E.coli</i>	88
6.5	Etude de l'activité NAPE synthase sur les membranes d' <i>E. coli</i>	89
7.	Méthodes de transgénèse chez <i>A. thaliana</i>	89
7.1	Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	89
7.2	Transformation stable d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par <i>Agrobacterium</i>	90
7.3	Méthodes d'analyses des <i>Arabidopsis</i> mutantes	91
7.3.1	Sélection par PCR d'une lignée homozygote pour l'insertion de l'ADN-T chez les plantes mutantes SALK 029716	91
7.3.2	Sélection des plantes transformées par « floral dipping »	92
7.4	Expression transitoire dans des cellules d'épiderme de feuille de tabac	92
7.5	Analyse de l'expression des protéines de fusion At1g78690-EYFP par microscopie confocale	93
7.6	Marquage histochimique GUS (β-glucuronidase)	93
8.	Analyse phénotypique	94
8.1	Analyse de phénotype racinaire	94
8.2	Culture de plantes sur milieu ± saccharose	94
Résultats		97
1.	Etudes bioinformatiques	97
1.1	Recherche « <i>in silico</i> » de nouveaux gènes codant pour des acyltransférases putatives d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	97
1.1.1	Criblage réalisé dans la base de données du TAIR à partir de la séquence YPR140wp de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	97
1.1.2	Recherche de motifs consensus à partir de la séquence de la protéine At1g78690p	98
1.2	Autres données sur les séquences nucléotidique et peptidique du gène At1g78690 et de sa protéine à partir de banques spécialisées.	99

1.2.1	Analyse de la séquence du gène At1g78690	100
1.2.2	Analyse de l'expression du gène At1g78690	100
1.2.3	Prédiction des domaines transmembranaires de la protéine At1g78690p	100
1.2.4	Analyse de la localisation potentielle de la protéine At1g78690p	102
2.	Mise en évidence d'une activité acyltransférase de la protéine At1g78690p chez <i>E. coli</i>	104
2.1	Mesure <i>in vitro</i> de l'activité Lyso-PC acyltransférase de la protéine At1g78690p à partir d'extraits de membranes d' <i>E. coli</i>	105
2.1.1	Tests enzymatiques réalisés à partir de [¹⁴ C]-LPC	105
2.2	Etude de la spécificité de la protéine At1g78690p en fonction de différents substrats lysophospholipidiques	106
2.2.1	Détermination des conditions de saturation de la protéine At1g78690p pour le substrat [¹⁴ C]-LPC	106
2.2.2	Test de dilution isotopique	107
2.3	Etude <i>in vivo</i> de la composition lipidique des souches d' <i>E. coli</i> transformées ou non avec le gène d'intérêt	108
2.4	Identification du lipide X synthétisé par la protéine At1g78690p chez <i>E. coli</i>	111
2.4.1	Par chromatographie sur couche mince (CCM)	111
2.4.1.1	Monodimensionnelles	111
2.4.1.2	Bidimensionnelles	112
2.4.2	Par analyse biochimique : test à la phospholipase D (PLD)	113
2.4.3	Par spectrométrie de masse : ESI-MS/MS	114
3.	Mesure <i>in vitro</i> de l'activité NAPE synthase de la protéine purifiée ou sur membranes d'<i>E. coli</i>	118
3.1	Construction de la protéine de fusion At1g78690-6HIS.	118
3.1.1	Vérification par SDS-PAGE et Western blot de la présence de la protéine At1g78690p-6HIS dans les 'bactéries transformées'	119
3.1.2	Mesure de l'activité <i>in vivo</i> de la protéine de fusion (At1g78690-6HIS) sur la synthèse de NAPE chez les 'bactéries transformées'	119
3.2	Mesure de l'activité de la protéine At1g78690p-6HIS purifiée par chromatographie d'affinité via un ÄKTAexplorer	121
3.2.1	Purification de la protéine At1g78690-6HIS	121
3.2.2	Réalisation d'anticorps anti-At1g78690-6HIS	122
3.2.3	Tests <i>in vitro</i> réalisés à partir de la protéine purifiée At1g78690-6HIS	123
3.2.4	Mesure de la synthèse chimique de NAPE catalysée par l'imidazole	123
3.3	Mesure de l'activité de la protéine At1g78690-6HIS purifiée par chromatographie d'affinité via le kit Ni Sepharose 6 Fast Flow TM	126
3.3.1	Purification de la protéine At1g78690-6HIS à l'aide du kit Ni Sepharose 6 Fast Flow TM	126
3.3.2	Tests enzymatiques avec la protéine At1g78690-6HIS purifiée à l'aide du kit Ni Sepharose 6 Fast Flow TM	127
3.3.3	Nouveaux tests enzymatiques à partir de la protéine At1g78690-6HIS purifiée	128
3.4	Mesure de l'activité d'At1g78690p <i>in vitro</i> à partir d'extraits de membranes d' <i>E. coli</i>	131
3.4.1	Premier test réalisé à partir d'acyl-CoA	131
3.4.2	Mesure <i>in vitro</i> de l'activité NAPE synthase à partir d'extraits de membranes d' <i>E. coli</i> en fonction de la taille et du degré d'insaturation du donneur d'acyle.	132
3.4.3	Cinétique de synthèse <i>in vitro</i> de NAPE à partir d'extraits de membranes d' <i>E. coli</i>	134
4	Etude fonctionnelle de la protéine At1g78690p chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	135
4.1	Etude de la composition lipidique du mutant d' <i>Arabidopsis thaliana</i> perte de fonction (ADN-T) pour le gène d'intérêt	135
4.1.1	Mesure par RT-PCR quantitative du taux de transcrit du gène At1g78690 chez les plantes ADN-T	135
4.1.2	Effet de l'absence de transcrit du gène d'intérêt sur la composition lipidique d' <i>A. thaliana</i>	136
4.2	Transformation et sélection de plantes « 35S » pour le gène d'intérêt	138
4.2.1	Mesure par RT-PCR quantitative du taux de transcrit du gène d'intérêt chez les plantes 35S::At1g78690.	139

4.2.2	Effet de la surexpression du gène d'intérêt sur la composition lipidique chez <i>A. thaliana</i> « 35S »	139
4.2.3	Analyse par spectrométrie de masse de la NAPE synthétisée chez les plantes transgéniques 35S::At1g78690	140
4.3	Analyse de l'activité promotrice du gène At1g78690	142
4.4	Etude de la localisation subcellulaire de la protéine At1g78690p	144
4.5	Analyses phénotypiques des plantes ADN-T (Salk 029716) pour le gène d'intérêt	145
4.6	Analyses phénotypiques des plantes « 35S » pour le gène d'intérêt	147
Discussion générale et perspectives		153
Références bibliographiques		163
Annexes		193
Publication et communications		198
Résumé/Summary		200

Lexique

ABA	Acide abscissique
ABI ^{1,2,3}	ABA insensitive 1,2,3
Abh4	α,β -hydrolase 4
ACP	Acyl carrier protein
AOS	Allene oxyde synthase
APS	Ammonium persulfate
APX	Ascorbate peroxydase
CaMV	Cauliflower mosaic virus (virus de la mosaïque du chou-fleur)
CAT	Catalase
CB	Récepteur cannabinoïde
CCM	Chromatographie sur couche mince
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
Ci	Curie
CID	Collision induced dissociation
CL	Cardiolipide
CoA	Coenzyme A
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
Ct	Threshold cycle
DAG	Diacylglycérol
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltoside
DGDG	Digalactosyldiacylglycérol
DHAP	Dihydroacetone phosphate
DIM	Detergent insoluble membrane
DMPE	Dimyristoylphosphatidyléthanolamine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDTA	Ethylene-diamine tetraacetic acid
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethyleneglycol tetraacetic acid
ESI	Electrospray ionisation
EYFP	Enhanced yellow fluorescent protein
FAAH	Fatty acid amide hydrolase
FFA	Free fatty acid (acide gras libre)
G3P	Glycerol-3-phosphate
G3P-AT	Glycérol-3-phosphate acyltransférase
GPI	Glycosyl phosphatidylinositol
GUS	β -glucuronidase
HPO	Hydroperoxydase
IMAC	Immobilized metal ion affinity chromatography
InsP3	Inositol tris phosphate
HPLC	High performance liquid chromatography
HPTLC	High performance thin layer chromatography
HR	Hypersensitive response (réponse d'hypersensibilité)
KO	Knock out
LOX	Lipoxygénase
LPA	Acide lysophosphatidique
LPC	Lysophosphatidylcholine
LPE	Lysophosphatidyléthanolamine
LPG	Lysophosphatidylglycérol
LPI	Lysophosphatidylinositol
LPL	Lysophospholipide
LPS	Lysophosphatidylsérine
LPA-AT	Lysophosphatidic acid acyltransférase

LPC-AT	Lysophosphatidylcholine acyltransférase
LPE-AT	Lysophosphatidyléthanolamine acyltransférase
LPG-AT	Lysophosphatidylglycérol acyltransférase
LPI-AT	Lysophosphatidylinositol acyltransférase
LPL-AT	Lysophospholipide acyltransférase
LPS-AT	Lysophosphatidylsérine acyltransférase
LRAT	Lecithin retinol acyltransférase
Lyso-NAPE	Lyso-N-acylphosphatidyléthanolamine
MBOAT	Membrane-bound-O-acyltransferase
MES	2-(N-Morpholino)-ethanesulfonic acid
MGDG	Monogalactosyldiacylglycérol
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduite
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite
NAE	N-acyléthanolamine
NAPE	N-acylphosphatidyléthanolamine
N-lysoPE	N-lysophosphatidyléthanolamine
NOS	Nitrate oxyde synthase
OEA	Oléoyléthanolamine
PA	Acide phosphatidique
PAL	Phenylalanine ammonia lyase
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Phosphatidylglycérol
PI	Phosphatidylinositol
PIP	Phosphatidylinositol-phosphate
PL	Phospholipide
PLA _{1,2}	Phospholipase A _{1,2}
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
PPAR α	Peroxisome proliferator activated receptor α
PS	Phosphatidylsérine
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RE	Réticulum endoplasmique
Rf	Rapport frontal
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RT	Transcription inverse
SDC-1	Stéaroyl-CoA désaturase-1
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Electrophorèse SDS en gel de polyacrylamide
SEA	Stéaroyléthanolamine
SIGNAL	Salk institute genomic analysis laboratory
SL	Sulfoquinovosyldiacylglycérol
sn _{1,2,3}	Numérotation régiospécifique des substituants sur le squelette glycérol
SOD	Superoxyde dismutase
TAG	Triacylglycérol
TAIR	The <i>Arabidopsis thaliana</i> information resource
TBS	Tris buffer saline
Δ 9-THC	Δ 9-tétrahydrocannabinol
TM	Segment transmembranaire
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside
X-Gluc	acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique

PARTIE I

INTRODUCTION

Introduction

Il existe *a minima* trois classes principales de lipides qui forment les membranes biologiques : les stérols, les sphingolipides et les glycérolipides. La distribution de ces lipides diffère d'un type de membranes à un autre. Par exemple, les galactolipides sont présents uniquement dans les membranes des chloroplastes, alors que les cardiolipides (CL) ne sont observés chez les eucaryotes que dans les membranes des mitochondries.

Chacune de ces classes de lipides est formée de plusieurs composés. Chez les plantes par exemple, la classe des stérols est constituée de stérols libres, comme le sitostérol, le campestérol ou le stigmastérol, mais également d'esters de stérols (c'est à dire des stérols acylés au niveau d'une fonction alcool), de stérylglycosides (qui correspondent à des résidus glycosylés du stérol), et de stérylglycosides acylés. Tout comme la classe des stérols, les glycérolipides constituent une classe de lipides comprenant un grand nombre de composés différents. On y retrouve les galactolipides (monogalactosyldiacylglycérol, MGDG ; et les digalactosyldiacylglycérol, DGDG), les sulfolipides et les phospholipides. Les glycérolipides sont constitués d'un squelette glycérol sur lequel sont estérifiés en position *sn1* et *sn2* deux acides gras. Cette structure de base correspond au diacylglycérol (DAG) (figure I-1). Les glycérolipides diffèrent par la composition de la tête polaire greffée en position *sn3* du DAG. Par exemple, les phospholipides présentent un groupement phosphate en position *sn3* du résidu glycérol, et au sein même des phospholipides, il existe un grand nombre de composés différents en fonction de la nature de la tête polaire branchée sur ce groupement phosphate (figure I-1).

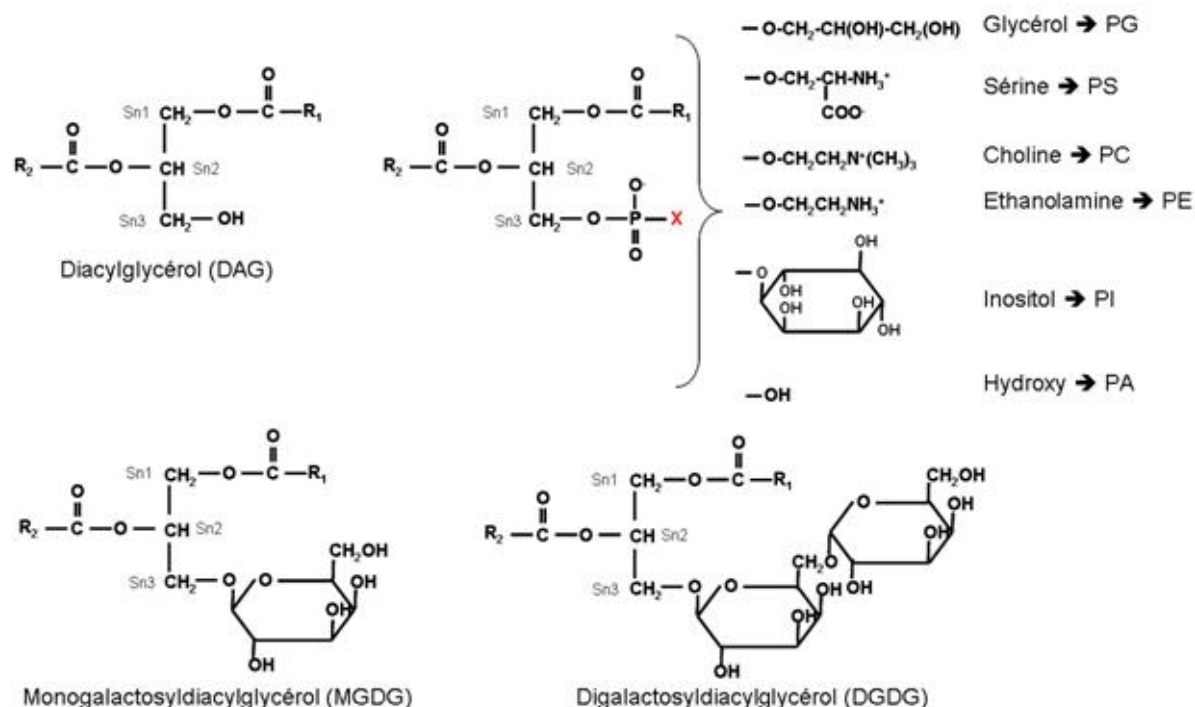


Figure I-1. Représentation de plusieurs phospholipides, du diacylglycérol (DAG) et de galactolipides (MGDG et DGDG).

Dans les membranes plasmiques de plantes, la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE) sont les principaux constituants phospholipidiques. Ils représentent entre 65 et 80% des phospholipides totaux contre 20 à 35% pour les autres espèces (phosphatidylglycérol (PG), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylsérine (PS) et acide phosphatidique (PA)) (tableau I-1).

	Seigle feuilles	<i>A. thaliana</i> feuilles	<i>S. tuberosum</i> feuilles	Maïs racines
PC	46,7	35,5	38,4	36
PE	34,4	38,9	35,7	32,3
PG	5,7	9	3,9	12,1
PI	2,2	10,3	7,5	10,5
PS	4,7	6,4	-	9,1
PA	5,4	-	10,2	-
Autres	<0,9	-	4,3	-
Références	Lynch et Steponkus, 1987	Uemura <i>et al.</i> , 1995	Palta <i>et al.</i> , 1993	Bohn <i>et al.</i> , 2001

Tableau I-1. Proportion des différents phospholipides dans les membranes plasmiques végétales. Les résultats sont exprimés en % des phospholipides totaux.

D'autres phospholipides minoritaires sont également présents dans les membranes, et ce sont souvent des molécules biologiquement actives. Ainsi le diacylglycérolpyrophosphate (DGPP) (Zalejski *et al.*, 2005 et 2006), les polyphosphoinositides (PIP₂) (Balla, 2006 ; Strahl et Thorner, 2007 ; Lee *et al.*, 2007 ;

Kusano *et al.*, 2008 ; Stenzel *et al.*, 2008), et le PA (Meijer et Munnik, 2003 ; Bargmann *et al.*, 2009) sont impliqués dans diverses voies de signalisation. Les N-acylphosphatidyléthanolamines (NAPE) comptent aussi parmi les lipides membranaires minoritaires. Ces phospholipides correspondent à une forme acylée de la PE au niveau de la fonction amine (figure I-2). Ils représentent par exemple 0,01% des phospholipides totaux des membranes plasmiques chez les animaux (Chapman *et al.*, 1993a ; Hansen *et al.*, 2000).

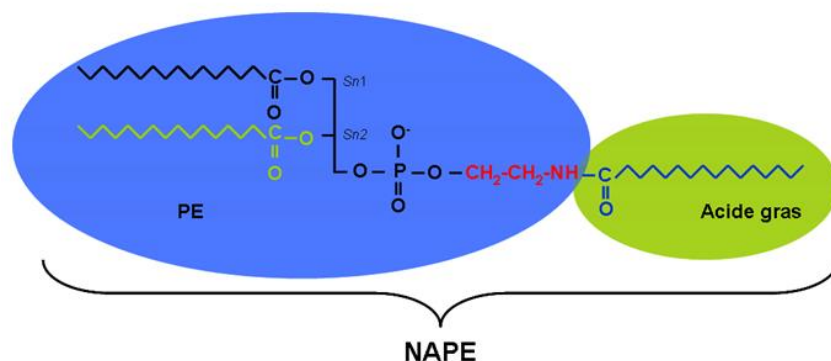


Figure I-2 Représentation de la N-palmitoyl-1-palmitoyl-2-palmitoyl-phosphatidyléthanolamine.

Les NAPE semblent jouer un rôle essentiel dans le maintien de la structure et la cohésion des membranes lors de différents stress (Lafrance *et al.*, 1990 ; Schmid *et al.*, 1990 ; Domingo *et al.*, 1993). Ces lipides permettent par exemple lors de dommages graves des tissus, comme lors d'ischémie du cerveau ou lors d'attaque cardiaque, de maintenir intacte la configuration des bicouches lipidiques des membranes afin qu'elles puissent continuer à assurer leurs nombreuses fonctions (comme le transport actif ou passif de molécules, la production d'énergie (ATP) ou encore la signalisation). De même, chez les plantes, lors de l'hydratation des graines ou du pollen, les NAPE semblent permettre la protection des membranes contre les fortes pressions osmotiques exercées à leurs surfaces.

Chez les plantes comme chez les animaux, les NAPE sont également connues pour être les précurseurs d'une autre famille de lipides : les N-acyléthanolamines (NAE) (figure I-3).



Figure I-3. Représentation de la N-palmitoyléthanolamine (NAE-16:0).

Les NAE, comme nous le verrons en détail dans la partie « Données Bibliographiques », sont des lipides impliqués dans de très nombreux processus cellulaires. Par exemple dans le règne animal, ils interviennent dans : la mémorisation (Marsicano *et al.*, 2002 ; Mazzola *et al.*, 2009), l'appétit (Rodriguez de Fronseca *et al.*, 2001 ; Fu *et al.*, 2003,

2005), l'induction du sommeil (Cravatt *et al.*, 1995 ; Guan *et al.*, 1997), le développement embryonnaire (Devane *et al.*, 1992 ; Wang *et al.*, 1999 ; Schmid *et al.*, 1997 ; Paria et Dey, 2000), l'apoptose (Sarker *et al.*, 2000 ; Hansen *et al.*, 2002), etc. Dans le cerveau des mammifères, les NAE se fixent aux récepteurs de types cannabinoïdes CB1 et CB2 (Di Marzo *et al.*, 2001b ; Movahed *et al.*, 2005) et participent ainsi à de nombreuses voies de signalisation. Dans le règne végétal, ces lipides interviennent également dans de nombreuses fonctions comme la germination (Chapman et Moore 1993b), le développement racinaire (Blancaflor *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2006), l'activation de gènes de défense lors d'attaques pathogènes (Tripathy *et al.*, 2003 ; Kang *et al.*, 2008), etc.

Les NAE sont produites par l'hydrolyse des NAPE par des phospholipase D (PLD), et sont dégradées en acide gras libre et éthanolamine par des fatty acid amide hydrolases (FAAH) (figure I-4).

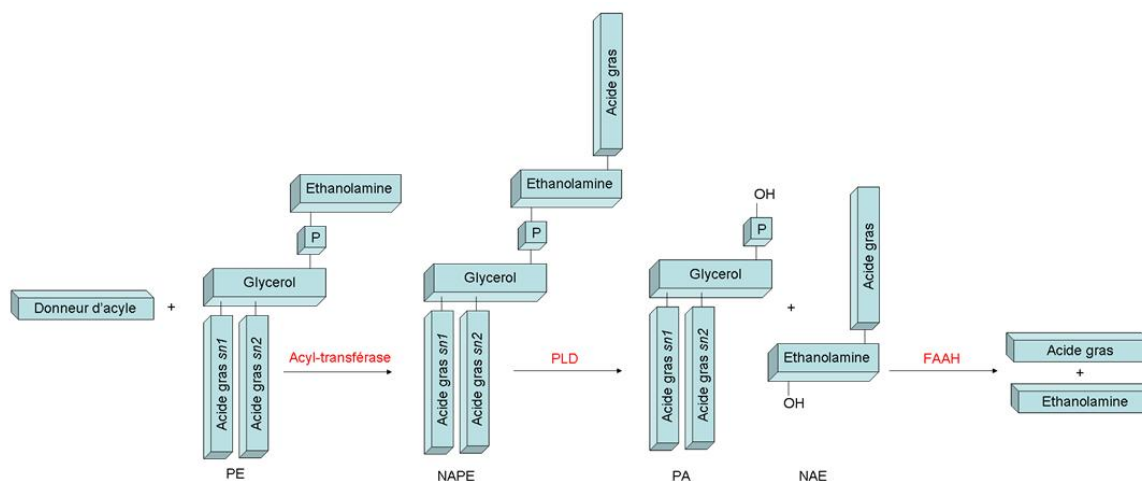


Figure I-4. Voie métabolique des NAE.

NAE, N-acyléthanolamine ; NAPE, N-acylphosphatidylethanolamine ; PA, Phosphatidic acid ; PLD, Phospholipase D ; FAAH ; Fatty acid amide hydrolase.

Toutes les enzymes de la voie métabolique des NAE ont été caractérisées dans le règne animal comme dans le règne végétal (Hammond *et al.*, 1995 ; Colley *et al.*, 1997 ; Cravatt *et al.*, 1996 ; Shrestha *et al.*, 2003 ; Wei *et al.*, 2006) à l'exception de l'enzyme catalysant la synthèse de NAPE. La protéine qui catalyse cette synthèse transfère une chaîne acyle d'une molécule donneuse : phospholipide ou acide gras libre, (Chapman *et al.*, 1993a ; Schmid *et al.*, 1990 ; Cadas *et al.*, 1997 ; Sugiura *et al.*, 1996a) sur la fonction amine de la PE. Il s'agit donc d'une acyltransférase.

Les acyltransférases sont des enzymes qui jouent un rôle important dans la synthèse des lipides. Ces enzymes sont également impliquées dans le transfert de lipides entre deux compartiments subcellulaires, et dans le « remodelage » des lipides membranaires. C'est

pour cela que l'équipe « homéostasie membranaire » du laboratoire de biogenèse membranaire s'intéresse à ces protéines. L'objectif de cette thèse a été de caractériser une acyltransférase putative d'*A. thaliana* (At1g78690p).

Dans la première partie de ce mémoire, nous présenterons les connaissances actuelles sur la composition en NAPE et NAE des différents tissus animaux et végétaux. Ensuite, après avoir détaillé les fonctions associées à ces lipides, les voies métaboliques de synthèse et de dégradation des NAPE et NAE seront présentées.

Dans la partie résultats, nous décrirons comment nous avons caractérisé l'activité d'At1g78690p chez *E. coli*, comment nous avons confirmé nos résultats avec la protéine At1g78690-6HIS purifiée, puis comment l'activité NAPE synthase de cette protéine a été démontrée *in planta* à l'aide de mutants KO ou de surexpression que nous avons générés.

La caractérisation de la protéine a été poursuivie en étudiant :

- Sa localisation cellulaire par microscopie confocale.
- Sa localisation tissulaire et temporelle par la stratégie gène rapporteur (GUS).

Enfin, nous avons recherché un phénotype lié à la présence ou à l'absence de cette protéine dans différentes lignées d'*A. thaliana*.

L'ensemble de nos résultats fait de la protéine At1g78690p la première NAPE synthase jamais décrite.

PARTIE II

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Données bibliographiques

1. Distribution des NAE et NAPE dans les cellules eucaryotes

Les NAPE et NAE sont deux lipides présents en faible quantité aussi bien chez les animaux (mammifères mais aussi oursins et mollusques ; Bisogno *et al.*, 1997 ; Sepe *et al.*, 1998), que chez les végétaux (Bomstein, 1965), les bactéries (Helmy *et al.*, 2002) et les levures (Merkel *et al.*, 2005). La distribution de ces lipides, ainsi que leur fonctions ont été principalement étudiées chez les animaux et les végétaux.

1.1 Chez les animaux

1.1.1 Distribution des NAPE

La présence de NAPE est généralement associée à des tissus lésés, abimés, par différents stress ou processus de vieillissement (Schmid *et al.*, 1990).

En conditions physiologiques « normales », ce phospholipide ne représente que 0,01% des phospholipides totaux chez les animaux, ce qui en fait une classe de lipide minoritaire des cellules. Il existe de nombreuses espèces de NAPE du fait des grandes variabilités de composition en acides gras en position *sn1*, *sn2* et amine de la PE. En ne considérant que la composition de la chaîne N-acyl des NAPE, dans le cerveau de rat, les 3 espèces majoritaires sont : le 16:0-NAPE (70-84%), le 18:1-NAPE (5-15%) et le 18:0-NAPE (11-12%). Le 20:4-NAPE (précurseur de l'anandamide (NAE-20:4) qui est la NAE la plus étudiée chez les animaux) représente seulement 0,4-0,6% des NAPE totales (Sugiura *et al.*, 1996b ; Cadas *et al.*, 1997). Ce taux de 20:4-NAPE est faible mais varie considérablement en fonction de la zone du cerveau étudiée (de 22 pmol.g⁻¹ de cerveau à 786 pmol.g⁻¹ de cerveau) et du stade de développement du rongeur (jeune rat ou adulte) (Yang *et al.*, 1999 ; Berrendero *et al.*, 1999). Dans les tissus rénaux de rat, les mêmes NAPE majoritaires sont observées : le 16:0-NAPE (41%), le 18:1-NAPE (18%) et le 18:0-NAPE (13%) mais le taux de 20:4-NAPE est beaucoup plus élevé (11%) par rapport à celui déterminé dans les tissus cérébraux (Deutsch *et al.*, 1997). Cette composition en NAE-20:4 est encore différente dans les testicules de rat (Bourre *et al.*, 1990).

Les quantités totales de 20:4-NAPE et de différentes NAPE, dans différents tissus de différentes espèces, sont regroupées dans le tableau II-1.

Tissus	Espèces	20:4-NAPE pmol/g	Total NAPE pmol/g tissu	Références
Cerveau	Rat	50	12072	Sugiura <i>et al.</i> , 1996b
		22	3666	Cadas <i>et al.</i> , 1997
		50-190 ^{a, b}	-	Yang <i>et al.</i> , 1999
		59-359 ^b	-	Bisogno <i>et al.</i> , 1999
		63 ^c	-	Berrendero <i>et al.</i> , 1999
		139-786	-	González <i>et al.</i> , 1999
		61	4248	Hansen <i>et al.</i> , 2000
Rétine	Bovine	51	-	Bisogno <i>et al.</i> , 1999
Corde spinale	Rat	320 ^b	-	Yang <i>et al.</i> , 1999
Rein	Rat	68	610	Deutsch <i>et al.</i> , 1997
Rate	Rat	50 ^a	-	Yang <i>et al.</i> , 1999
Testicules	Rat	274	2525	Sugiura <i>et al.</i> , 1996a
		242	2887	Kondo <i>et al.</i> , 1998
		470 ^a	-	Yang <i>et al.</i> , 1999
Utérus	Souris	27-81 ^b	713-4095 ^d	Schmid <i>et al.</i> , 1997

Tableau II-1. Quantité de NAPE *in vivo* dans différents tissus et organismes (Hansen *et al.*, 2000).

a : Calcul fait sur 100mg de protéines par g de tissu

c : sur rats adultes (>8 jours)

b : dans différentes régions du cerveau

d : à différents stades de grossesse

- : non déterminé

1.1.2 Distribution des NAE

Même si le 20:4-NAE (anandamide) est l'espèce la plus étudiée de la famille des N-acyléthanolamines, une grande variété de NAE existe en fonction de la taille de l'acide gras et de son degré d'insaturation. La quantité de NAE est généralement comprise entre 100-600 pmol.g⁻¹ de tissu, sauf dans l'utérus où la quantité d'anandamide (94% des NAE totales) est beaucoup plus importante (jusqu'à 20000 pmol.g⁻¹ de tissu). Hormis l'utérus, dans les autres tissus, les 20:4-NAE ne représentent que 1 à 10% des NAE totales.

Contrairement aux NAPE qui sont localisées exclusivement dans les membranes, les NAE sont retrouvées également dans les milieux aqueux comme le cytosol, le sang, le milieu extra cellulaire ou encore dans les fluides cérébrospinaux humains (Giuffrida and Piomelli, 1998 ; Giuffrida *et al.*, 1999 ; Walker *et al.*, 1999 ; Leweke *et al.*, 1999). Les quantités de NAE dans différents tissus de différentes espèces sont regroupées dans le tableau II-2.

De façon générale, la quantité de NAPE est supérieure à la quantité de NAE dans les tissus, à l'exception du tissu utérin de souris où la quantité de NAE peut être jusqu'à 5 fois supérieure à la quantité de NAPE (Schmid *et al.*, 1997).

Tissus	Espèces	20 :4-NAE pmol/g de tissu	Total NAE pmol/g de tissu	Références
Cerveau	Homme	25-148 ^a	-	Felder <i>et al.</i> , 1996
		20-29 ^a	-	Felder <i>et al.</i> , 1996
	Rat	4	597	Sugiura <i>et al.</i> , 1996b
		12-35 ^{a, b}	513-1397 ^{a, b, c}	Koga <i>et al.</i> , 1997
		11	136	Cadas <i>et al.</i> , 1997
		10-87 ^a	-	Bisogno <i>et al.</i> , 1999a
		15 ^d	-	Berrendero <i>et al.</i> , 1999
		< ou = 25 ^a	-	González <i>et al.</i> , 1999
	Souris	10-15	-	Schmid <i>et al.</i> , 1997
	Porc	383	-	Devane <i>et al.</i> , 1992
		17	2037	Schmid <i>et al.</i> , 1995, 1996
Rétine	Bovin	10	957	Schmid <i>et al.</i> , 1995, 1996
	Chèvre	-	835	Schmid <i>et al.</i> , 1995, 1996
	Rat	-	185	Straiker <i>et al.</i> , 1999
Cœur	Bovin	64	-	Bisogno <i>et al.</i> , 1999b
	Homme	10	-	Felder <i>et al.</i> , 1996
Foie	Rat	27	130 ^{b, c}	Koga <i>et al.</i> , 1997
	Rat	31 ^a	176	Koga <i>et al.</i> , 1997
Rein	Rat	8	186	Deutsch <i>et al.</i> , 1997
Rate	Homme	15	-	Felder <i>et al.</i> , 1996
		6	-	Felder <i>et al.</i> , 1996
		77 ^b	286 ^{b, c}	Koga <i>et al.</i> , 1997
Thymus	Rat	-	210 ^{b, c}	Koga <i>et al.</i> , 1997
Testicules	Rat	6	122	Sugiura <i>et al.</i> , 1996a
		11 ^b	109 ^{b, c}	Koga <i>et al.</i> , 1997
		5	97	Kondo <i>et al.</i> , 1998
Utérus	Souris	2215-20982 ^e	2719-22269 ^e	Schmid <i>et al.</i> , 1997
Peau	Rat	23	-	Felder <i>et al.</i> , 1996
		49	741h	Calignano <i>et al.</i> , 1998
Cerveau	Rat	1,5pmol/300μl	3,7pmol/300μl ^c	Giuffrida <i>et al.</i> , 1999
		2,8 fmol/15μl	-	Walker <i>et al.</i> , 1999
ECF	Homme	0,3pmol/ml	3pmol/ml ^c	Leweke <i>et al.</i> , 1999
Plasma	Rat	5pmol/ml	30pmol/ml ^c	Giuffrida et Piomelli, 1998

Tableau II-2. Quantité *in vivo* de NAE dans différents organismes et tissus (Hansen *et al.*, 2000).

a : dans différentes régions du cerveau

e : tests effectués à différents stades embryonnaires

b : rats âgés de 24heures

ECF : Fluide extracellulaire cérébrospinal

c : seules les 16:0, 18:1 et 20:4-NAE sont déterminées

d : rats adultes

1.2 Chez les plantes

1.2.1 Distribution des NAPE

C'est en étudiant la composition lipidique de farine de blé que Bomstein a le premier mis en évidence la présence de NAPE chez les végétaux (Bomstein, 1965). En 1969, Dawson et son équipe ont confirmé la présence de ce lipide dans les graines de plantes supérieures (Dawson *et al.*, 1969). Dans les années 1970, lors d'une étude sur la composition des phospholipides de graines de soja en germination (Wilson et Rinne, 1974), du phosphatidylméthanol a été pris à tort pour de la NAPE (Roughan *et al.*, 1978), ce phosphatidylméthanol étant synthétisé *in vitro* par les PLD à partir du méthanol présent lors des extractions lipidiques. Cette erreur a conduit plusieurs biochimistes à douter de l'existence de NAPE chez les végétaux.

Bien que la présence de NAPE chez les plantes ait été initialement controversée, des approches biochimiques et biophysiques, comme la spectrométrie de masse (l'ESI MS/MS), ont confirmé la présence de cette classe de lipides chez les végétaux (Chapman *et al.* 1993a). La quantité de NAPE mesurée chez les plantes est très faible, par exemple dans le coton, elle est comprise entre 1,9 mol% et 3,2 mol% des phospholipides totaux en conditions « normales » (Chapman *et al.*, 1995 ; Sandoval *et al.*, 1995). Cette quantité de NAPE est cependant augmentée lors de différents stress. Par exemple, la teneur de NAPE qui est de $13 \pm 4 \text{ nmol.g}^{-1}$ de poids frais dans des cellules de pomme de terre en condition de « non stress » est augmentée de plus de 13 fois en conditions d'anoxie des cellules (Rawyler *et al.*, 2001). La quantité de NAPE est aussi augmentée durant les quelques heures suivant l'imbibition des graines, c'est-à-dire pendant leur réhydratation (Sandoval *et al.*, 1995). Cette augmentation de NAPE dans les graines est corrélée à une augmentation de l'activité NAPE synthase (figure II-1).

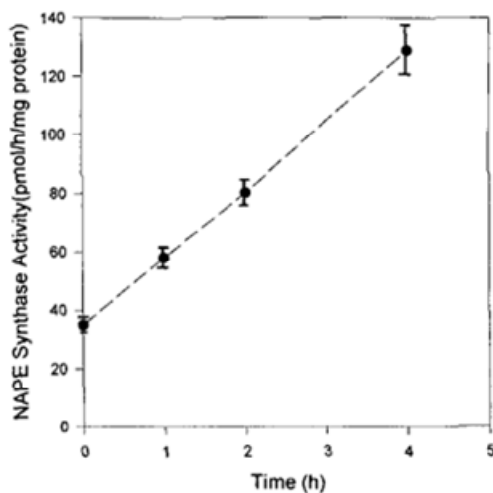


Figure II-1. Mesure de l'activité spécifique de la NAPE synthase lors de l'imbibition de la graine.

Tests réalisés sur un homogénat de graines (environ 10mg de protéines) + $[1-^{14}\text{C}]$ -acide palmitique. Les essais sont réalisés dans un volume final de 0,5ml sous agitation, 30 min à 45°C. La réaction est stoppée par ajout d'isopropanol chaud (Sandoval *et al.*, 1995).

L'espèce moléculaire de NAPE qui augmente le plus durant cette période est la N-linoleoyl-16:0/18:2-PE et la N-palmitoyl-18:2/18:2-PE (N-*sn1/sn2*-PE) (Sandoval *et al.*, 1995). Les espèces majoritaires de NAPE dans les graines imbibées et sèches sont présentées dans le tableau II-3.

Sèche		Imbibée	
m/z	Espèce moléculaire	m/z	Espèce moléculaire
952	N-palmitoyl-16:0/18:2-PE	952	N-palmitoyl-16:0/18:2-PE
976	N-linoleoyl-16:0/18:2-PE N-palmitoyl-18:2/18:2-PE	976	N-linoleoyl-16:0/18:2-PE N-palmitoyl-18:2/18:2-PE
994	N-palmitoyl-19:0/18:2-PE N-linoleoyl-16:0/19:0-PE		

Tableau II-3. Récapitulatif des espèces moléculaires de NAPE analysées par spectrométrie de masse dans des graines de coton sèches ou imbibées (Sandoval *et al.*, 1995).

1.2.2 Distribution des NAE

Chez les végétaux, la longueur de la chaîne aliphatique des NAE varie entre 12 et 18 atomes de carbone et son degré d'insaturation varie entre 0 et 3. Les NAE sont présentes dans de nombreuses espèces de plantes et leurs quantités sont fonction des variétés étudiées (Venables *et al.*, 2005). Par exemple la quantité de NAE dans le petit pois (*Pisum sativum* cv early Alaska) est de $490 \pm 89 \text{ ng.g}^{-1}$ de graines, tandis que le coton (cv Stoneville 7A glandless) contient $1608 \pm 309 \text{ ng}$ de NAE par gramme de graines. Comme dans le cas des NAPE, la quantité de NAE augmente rapidement au début de la réhydratation des graines, et chute très fortement ensuite. Par exemple dans les graines de coton, 4 heures après l'imbibition, la quantité de NAE passe de 1600 ng.g^{-1} de poids frais à 760 ng.g^{-1} de poids frais. Cette diminution de la teneur en NAE continue tout le long de la germination jusqu'à 24h après la réhydratation. De même chez *A. thaliana*, la quantité de NAE chute de 2000 ng.g^{-1} de poids frais à 1000 ng.g^{-1} de poids frais en 24h puis à 500 ng.g^{-1} de poids frais après 96 heures (Wang *et al.*, 2006).

De façon générale, les NAE à 16 et 18 atomes de carbone sont les espèces majoritaires dans les graines. Les autres NAE, à 12 ou 14 atomes de carbone, sont elles aussi présentes mais en plus faible quantité (tableau II-4). Il a été observé que les espèces majoritaires des NAE retrouvées dans les graines ne sont pas représentatives de l'abondance des espèces d'acides gras présents dans cet organe (Chapman *et al.*, 1999).

Type de plante	Quantité de NAE		Ordre d'abondance	Références
	totale (ng.g ⁻¹ de poids frais)			
Coton	1608±309		18:2>16:0>18:1=12:0	Chapman <i>et al.</i> , 1999
Maïs	1211±156		18:2=18:1>16:0=12:0	Chapman <i>et al.</i> , 1999
Arabidopsis	2000		18:2>16:0>12:0=18:1	Wang <i>et al.</i> , 2006
Soja	1079±172		18:2>16:0>18:1=12:0	Chapman <i>et al.</i> , 1999
Cacahuète	958±78		18:1>18:2=16:0>12:0	Chapman <i>et al.</i> , 1999
Gombo	792±121		18:2>16:0=18:1=12:0	Chapman <i>et al.</i> , 1999
Tomate	742±156		18:2>12:0=18:1>16:0	Chapman <i>et al.</i> , 1999
Ricin	627±29		18:2>12:0>18:1>16:0	Chapman <i>et al.</i> , 1999
Petit pois	490±89		18:2=18:1=12:0>16:0	Chapman <i>et al.</i> , 1999

Tableau II-4. Composition des NAE dans les graines de différentes plantes.

Le profil des NAE dans les tissus végétatifs des plantes est très différent de celui déterminé dans les graines. Effectivement les NAE les plus abondantes dans les feuilles de plusieurs espèces sont les NAE-14:0 et les NAE-12:0 (Chapman, 2004).

De plus, lors de stress comme une attaque pathogène, la quantité de NAE augmente. Cette quantité est par exemple multipliée par 6 dans une culture cellulaire de *Nicotiana tabacum* en présence d'un éliciteur comme la xylanase (qui mime une attaque pathogène) (Chapman *et al.*, 1998). Comme nous le verrons plus loin, ces NAE synthétisées lors de ces stress sont impliquées dans la mise en place de différentes réponses cellulaires chez la plante (Tripathy *et al.*, 1999).

2. Fonctions des NAPE et des NAE

2.1 Fonctions des NAPE chez *E. coli*

Récemment une fonction a été attribuée aux NAPE chez des bactéries *E. coli* déficientes pour la synthèse de cardiolipides (CL) (souche UE54) (Mileykovskaya *et al.*, 2009). Les CL sont des lipides supposés être impliqués dans la mise en place de la division cellulaire chez ces bactéries *via* la formation de petits domaines au niveau des pôles des cellules et près de la région du site de division (Mileykovskaya et Dowhan, 2005) (figure II-2).

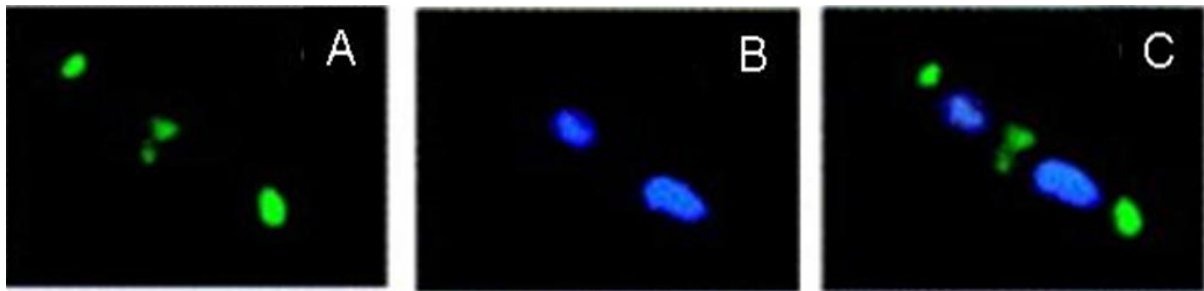


Figure II-2. Localisation des cardiolipides chez *E.coli* marqués au NAO (vert) et de l'ADN marqué au DAPI (bleu). A, coloration des cardiolipides au NAO ; B, coloration de l'ADN au DAPI ; C, superposition des images A et B. NAO, 10-N-nonyl acridine orange; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole, (Mileykovskaya et Dowhan, 2005).

La mise en place de ces domaines permettrait l'interaction des protéines impliquées dans la division des bactéries comme la réplicase, ou des protéines du cytosquelette (Mileykovskaya et Dowhan, 2005). Cependant ces bactéries UE54 présentent une capacité de division identique à celle des bactéries sauvages malgré l'absence de synthèse de CL. Des analyses par spectrométrie de masse de la composition lipidique de ces bactéries ont montré un enrichissement en NAPE au niveau des pôles et de la région centrale des bactéries. Il a été proposé que la NAPE chez cette souche permette, de la même façon que les CL, la mise en place de domaines de fixation de plusieurs protéines impliquées dans les processus de division cellulaire (Mileykovskaya *et al.*, 2009).

2.2 Fonctions des NAPE chez les cellules eucaryotes

Comme nous l'avons mentionné plus haut, les NAPE sont accumulées chez les animaux dans différents tissus dans des conditions susceptibles d'entraîner une dégradation des membranes intracellulaires, comme cela est le cas par exemple dans des cerveaux ischémiques (Natarajan *et al.*, 1985, Moesgaard *et al.*, 2000), dans des tissus cardiaques après un infarctus (Epps *et al.*, 1980) ou encore lors de la dégénérescence de cellules de l'épiderme (Berdyshev *et al.*, 2000). Des études biophysiques ont montré que les NAPE aident à stabiliser la configuration des membranes (Schmid *et al.*, 1990 ; Domingo *et al.*, 1993). La chaîne acyle associée à l'éthanolamine de la NAPE contribue à cet effet de stabilisation. En effet à partir de 10 atomes de carbone, la chaîne d'acide gras située en position amine de la PE a la même orientation que les groupements acyles en position *sn1* et *sn2* du squelette glycérol (c'est-à-dire vers l'intérieur de la bicouche lipidique). Ce repliement de chaîne permet au groupement carbonyle (C=O) de la chaîne d'acide gras ainsi qu'au groupement amine (NH) de la tête polaire de la PE de favoriser les liaisons hydrogènes intermoléculaires ce qui augmente la stabilité des membranes (Lafrance *et al.*, 1997 ; Domingo *et al.*, 1994). De plus, chez les animaux, les NAPE peuvent interagir avec le

cholestérol des membranes ou des domaines membranaires pour jouer sur leur fluidité et donc leur stabilité. Il a donc été proposé que les NAPE participent au maintien de la compartimentation cellulaire dans les tissus en conditions de stress (Schmid *et al.*, 1990 ; Lafrance *et al.*, 1990).

Un exemple de l'effet stabilisateur des NAPE chez les plantes est observé au niveau du pollen et des graines. Les forces osmotiques exercées sur les membranes de ces organes lors de leur réhydratation sont susceptibles d'altérer leur structure. Or durant la réhydratation, une augmentation de la quantité de NAPE a été mesurée (Sandoval *et al.*, 1995). Il a donc été proposé que la synthèse accrue de NAPE (figure II-3) durant la réhydratation du pollen ou des graines, permette de stabiliser les structures membranaires intracellulaires.

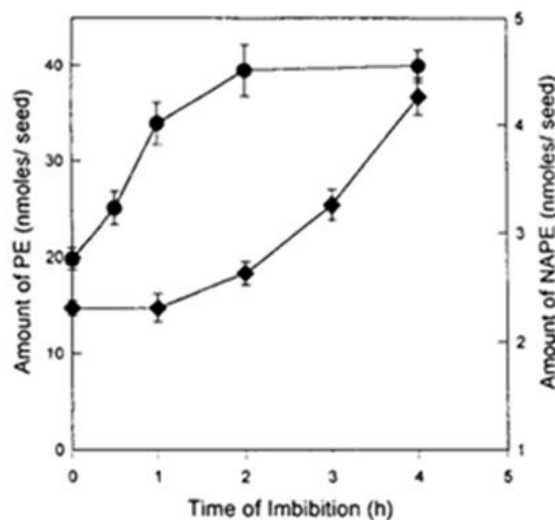


Figure II-3. Quantités de PE(●) et de NAPE(♦) mesurées dans des graines de coton en fonction du temps d'imbibition (Sandoval *et al.*, 1995)

Par ailleurs, en conditions d'anoxie les activités acylhydrolases sont augmentées dans les cellules de *Solanum tuberosum* L. cv Bintje (pomme de terre) en culture. Ces activités produisent des acides gras libres susceptibles de provoquer une désorganisation des structures membranaires. Une telle destruction semble être évitée par l'augmentation de la synthèse de NAPE que l'on observe parallèlement à l'augmentation des activités « lipolytic acyl hydrolase » (Figure II-4) (Rawyler et Braendle, 2001). Parmi les NAPE qui sont synthétisées dans ces conditions, la présence d'une espèce normalement absente en conditions de normoxie, la NAPE 16/18/16 (*amine/sn1/sn2*), est observée.

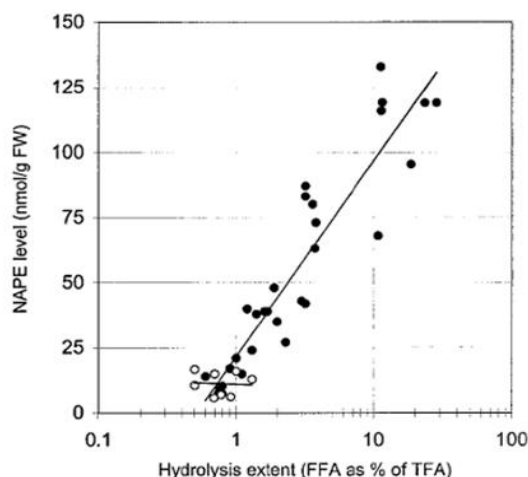


Figure II-4. Corrélation entre la synthèse de NAPE et l'accumulation des FFA (free fatty acid, acide gras libre) causée par les conditions d'anoxie dans les cellules de *Solanum tuberosum* L. cv Bintje. (●) conditions d'anoxie; (○) contrôle (normoxie) $R^2=0,93$. (Rawyler et Braendle, 2001).

Ainsi les NAE sont des lipides connus pour leur implication dans la stabilité des membranes lors de stress chez les animaux comme chez les végétaux. Cependant, les NAE sont davantage identifiées comme les lipides précurseurs des NAE, lipides médiateurs impliqués dans de nombreux processus cellulaires chez les animaux comme chez les végétaux.

2.3 Fonctions et effets des NAE

2.3.1 Chez les animaux

Chez les animaux, la NAE la plus étudiée est l'anandamide ou encore la N-arachidonique-éthanolamine (NAE-20:4), qui comme le Δ^9 THC (Δ^9 -tetrahydrocannabinol) retrouvé dans le cannabis, peut se fixer et activer des récepteurs de type cannabinoïdes centraux (CB1) et périphériques (CB2), mais également des récepteurs de type vanilloïdes (VB) (Movahed *et al.*, 2005). D'autres NAE, comme les NAE-C22 et les NAE-C20 ayant de 3 à 6 insaturations, peuvent activer ces mêmes récepteurs (Martin *et al.*, 1999). Les fonctions des NAE chez les animaux sont nombreuses et variées. Ces lipides interviennent dans les notions de satiété, de stress, de l'acquisition de la mémoire, du sommeil, de la prolifération cellulaire ou de l'apoptose, de l'embryogenèse, des processus inflammatoires et de la nociception.

2.3.1.1 Implication des NAE dans la notion de satiété et sur la prise de poids

L'oléoyléthanolamine (OEA, NAE-18:1) est un lipide naturel qui régule la notion de satiété *via* un effet « anorexique » chez le rat (figure II-5). Ce lipide ne se fixe pas aux récepteurs de type cannabinoïdes (CB1 et CB2) mais a une forte affinité pour les récepteurs PPAR α (peroxisome-proliferator-activated-receptor- α), qui régulent plusieurs aspects du métabolisme lipidique (Rodriguez de Fronseca *et al.*, 2001 ; Fu *et al.*, 2003, 2005).

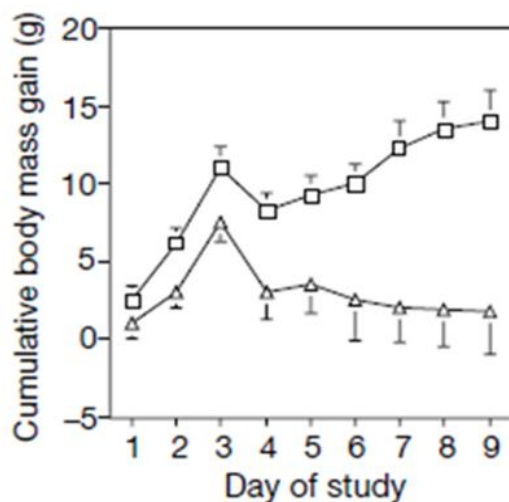


Figure II-5. Effet de l'administration quotidienne d'oléylethanolamine (OEA) sur le poids du rat. (□) rat contrôle ; (Δ) rat traité à l'OEA (Rodriguez de Fronseca *et al.*, 2001).

L'administration d'OEA chez le rat s'accompagne d'une augmentation du métabolisme lipidique et de la répression de la nitrique oxyde synthase (NOS), une enzyme stimulant la prise de nourriture chez les animaux (Janero, 2001). L'OEA intervient également dans l'activation de certaines régions du cerveau comme par exemple, l'hypothalamus qui est aussi impliqué dans le contrôle de la satiété (Terrazzino *et al.*, 2004).

La stéaroyléthanolamine (SEA, NAE-18:0) exerce également un « effet anorexique » chez le rat (figure II-6), mais selon un mode d'action différent de l'OEA.

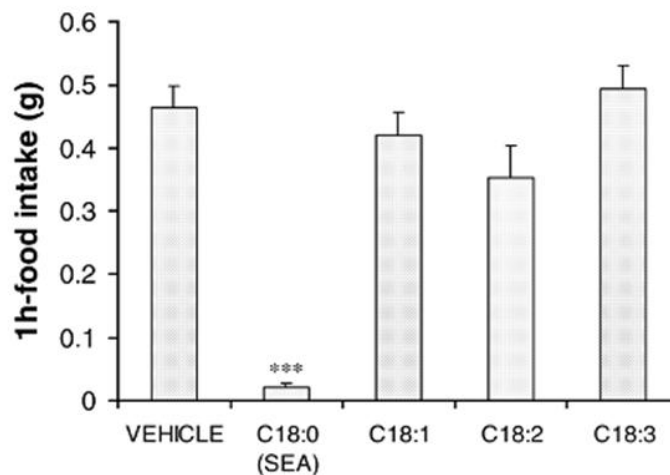


Figure II-6. Effet de l'injection de différents NAE sur la quantité de nourriture ingérée chez le rat 1 heure après l'injection de SEA (stéaroyléthanolamine) (Terrazzino *et al.*, 2004).

En effet, après une administration de SEA, la diminution du nombre de prises de nourriture et la perte de poids chez l'animal ne s'accompagnent pas d'une activation des récepteurs PPAR α (Terrazzino *et al.*, 2004). Cependant, l'injection de SEA induit une diminution du taux de transcrit de la stéaroyl-CoA désaturase-1 (SCD-1), diminution qui entraîne une réduction de la masse corporelle similaire à celle observée chez des souris knock out (KO) déficientes pour cette enzyme (Cohen *et al.*, 2002). Par ailleurs, la diminution du taux de SCD-1 dans le foie de souris s'accompagne d'une augmentation de la teneur en palmitoyléthanolamine (PEA). Cette NAE faciliterait l'action d'autres NAE endogènes (comme l'OEA) dans les processus de perte de poids en inhibant l'expression des FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolases responsables de la dégradation des NAE en éthanolamine et acide gras libre) (Di marzo *et al.*, 2001a, Terrazzino *et al.*, 2004). Cependant, les mécanismes provoquant cette diminution de transcrit (SCD-1) chez ces animaux ne sont pas encore clairement établis.

Contrairement aux NAE-18:0 et NAE-18:1, la présence d'anandamide au niveau de l'hypothalamus pourrait être responsable d'une augmentation de la prise de nourriture chez la souris en activant des récepteurs CB1 présents dans cette région du cerveau (Di Marzo *et al.*, 2001b). De plus, les leptines impliquées dans la diminution de la prise de nourriture chez

les mammifères *via* un retour d'information des adipocytes à l'hypothalamus (Friedman et Halaas, 1998 ; Ziyhan *et al.*, 2009) peuvent diminuer la quantité d'anandamide dans cette région du cerveau.

2.3.1.2 Implication des NAE sur le comportement

La partie basolatérale de l'amygdale dans le cerveau ainsi que le cortex antérieur préfrontal et l'hippocampe sont des structures impliquées dans la régulation des émotions et du comportement (Cahill et McGaugh, 1998). Elles contiennent de nombreux récepteurs CB1. L'anandamide, comme nous l'avons déjà indiqué, peut se fixer sur ces récepteurs et moduler les transmissions GABAergique et glutamatergique dans ces régions du cerveau (Freund *et al.*, 2003). L'utilisation d'inhibiteurs de FAAH sur des souris ou l'utilisation de souris KO pour cette enzyme ont montré que ces animaux présentaient un niveau de stress plus important que les souris contrôles (Gaetanie *et al.*, 2003).

2.3.1.3 Implication des NAE dans les phénomènes de mémorisation

L'acquisition et le stockage des informations est l'une des fonctions de base du système nerveux chez les animaux. Des études ont montré que l'abus de Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), ligand des récepteurs CB1, entraînait des problèmes de performance de la mémoire similaires à ceux provoqués par des lésions de l'hippocampe (Hampson et Deadwyler, 1998). Comme nous l'avons déjà vu, les récepteurs CB1 et l'anandamide sont présents dans différentes régions du cerveau dont celles impliquées dans l'apprentissage (l'hippocampe ou l'amygdale). Il a donc été supposé que l'anandamide était impliquée dans la mémorisation en activant des récepteurs CB1 (Marsicano *et al.*, 2002). Des récentes études ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs pour les FAAH au niveau de ces régions du cerveau permettait une augmentation de la quantité de plusieurs NAE comme l'OEA, le PEA (ligand des récepteurs PPAR α) et l'anandamide. Cette augmentation de NAE est corrélée à une mémorisation plus efficace chez le rat (Mazzola *et al.*, 2009).

2.3.1.4 Implication des NAE dans l'induction du sommeil

Différentes NAE, comme les NAE-18:2, sont des molécules retrouvées dans le liquide cébrospinal des chats privés de sommeil, mais également dans le liquide cébrospinal du rat et de l'homme. L'injection de NAE-18:2 au niveau du cortex chez le rat induit la mise en place du sommeil, ce qui suggère le rôle de ce lipide dans ce processus (Cravatt *et al.*, 1995). L'induction du sommeil par le NAE-18:2 est due à l'inactivation des jonctions GAP

entre les cellules gliales du cerveau. Ce blocage permet de réguler les communications entre les cellules du cerveau et de jouer ainsi sur des événements neuronaux importants comme la mise en place du sommeil (Guan *et al.*, 1997).

2.3.1.5 Implication des NAE sur la prolifération cellulaire, l'apoptose et la nécrose

L'anandamide peut être produite lors de choc septique *via* l'augmentation de LPS (lipopolysaccharides) dans l'organisme (Liu *et al.*, 2006). Cette augmentation d'anandamide s'accompagne de la multiplication du nombre de macrophages dans la circulation sanguine (Varga *et al.*, 1998) et stimule la production de plaquettes lors d'hémorragies (Pestonjamas et Burstein, 1998). Cependant si l'anandamide peut induire une augmentation du nombre de cellules, elle peut également induire l'apoptose cellulaire. En effet, l'ajout d'anandamide dans le milieu de culture de cellules pheochromocytoma (PC-12) de rat s'accompagne d'une augmentation de la quantité intracellulaire d'anion superoxyde et d'une activation des caspases 3 (Sarker *et al.*, 2000) qui sont impliquées dans la mise en place des processus de mort cellulaire (figure II-7) (Stefanis *et al.*, 1999).

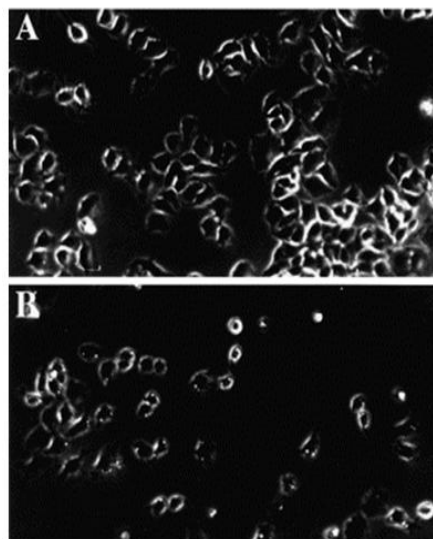


Figure II-7. Effet de l'anandamide sur la culture cellulaire de cellules pheochromocytoma (PC-12) de rat. A, culture contrôle ; B, culture en présence de 10µM d'anandamide (Sarker *et al.*, 2000).

De plus, lors de lésions cérébrales pouvant induire des nécroses, il est possible de mesurer une augmentation de la quantité de NAE. Les NAE peuvent agir directement soit en inhibant le développement de la nécrose, ou en stimulant l'apoptose des cellules proches de la nécrose (pour éviter sa propagation), ou encore en inhibant la fuite des médiateurs responsables de l'induction des nécroses et des inflammations sur les tissus sains (Hansen *et al.*, 2002).

2.3.1.6 Implication des NAE et des récepteurs CB1 dans l'implantation de l'embryon chez la souris

L'implantation de l'embryon dans l'endomètre de l'utérus de la souris n'est possible que dans une fenêtre de temps très courte (Paria *et al.*, 1993 ; 1996). Le succès de l'implantation de l'embryon résulte d'une relation étroite entre un blastocyste actif (embryon) et un utérus réceptif à l'implantation. Chez la souris, l'existence de récepteurs CB1 fonctionnels sur des embryons à partir de stades précoces (pré-implantatoire) a été mise en évidence, et la présence d'anandamide dans les tissus utérins de souris en gestation a été détectée (Devane *et al.*, 1992) (figure II-8).

Mais si l'anandamide active dans un premier temps le développement du blastocyste (Wang *et al.*, 1999), il est indispensable pour l'implantation de l'embryon que cette anandamide soit présente en quantité très faible dans l'utérus de souris. En bon accord, c'est au 4^{ème} jour de gestation (qui correspond à la période où l'utérus est le plus réceptif à l'implantation) que le taux d'anandamide est le plus bas, sa quantité augmentant très rapidement au 5^{ème} et 6^{ème} jour (Schmid *et al.*, 1997). Ainsi le développement de l'embryon et son implantation sont en partie contrôlés par la quantité d'anandamide présente au niveau de l'utérus (Paria et Dey, 2000).

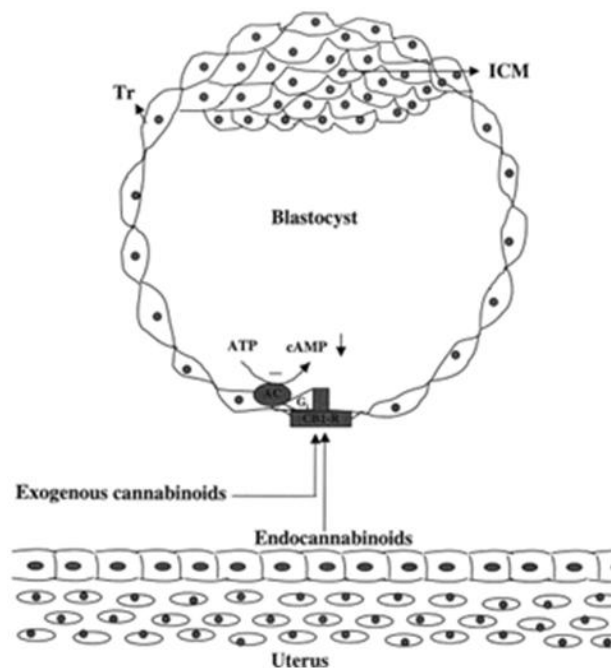


Figure II-8. Schéma représentant l'interaction possible entre les NAE et les récepteurs CB1 de l'embryon. AC, adényl cyclase ; ATP, adénosine triphosphate ; AMP, adenosine monophosphate, ICM, inner cell mass ; Tr, trophoblaste (Paria et Dey, 2000).

2.3.1.7 Implication des NAE dans les processus anti-inflammatoires

Les réactions cutanées, dermatites par exemple, concernent environ 5% des hommes et 11% des femmes dans les pays industrialisés (Karsak *et al.*, 2007). Il a été démontré que des souris KO pour les CB1 présentent des réactions inflammatoires beaucoup plus prononcées que des souris contrôles. En revanche des souris KO pour la FAAH, qui ont un niveau d'anandamide et de palmitoylethanolamine (NAE-16:0) plus élevé, sont moins sensibles aux réactions inflammatoires cutanées. Ces résultats montrent que les NAE ont un rôle dans la mise en place de ces réactions (Karsak *et al.*, 2007 ; Ahn *et al.*, 2009).

2.3.1.8 NAE et perception de la douleur

La présence de récepteurs CB1 et d'anandamide dans les aires d'intégration de la douleur dans le cerveau et au niveau de la corde spinale chez les animaux (Tsou *et al.*, 1998) suggère l'implication de la voie endocannabinoïde dans la régulation de la transmission du message nerveux de la douleur au niveau du système nerveux central (Calignano *et al.*, 1998). En bon accord, l'injection d'anandamide et de NAE-16:0 chez le rat permet de diminuer jusqu'à 100 fois la sensation de la douleur chez cet animal. Ces deux molécules agissent en synergie sur ces voies de réponse, en activant respectivement les récepteurs CB1 et CB2 (localisés en périphérie du système nerveux central) (Calignano *et al.*, 1998, Pertwee, 2001).

2.3.2 Chez les plantes

2.3.2.1 Activation des réponses courtes et longues de défense des plantes lors d'attaques pathogènes

a. Rappels

Lors d'attaques pathogènes, la plante perçoit la présence de molécules produites par l'agent parasite : les éliciteurs. Ces molécules de nature très variable (oligosaccharide, protéine, lipide etc.) activent les réponses de défense des plantes. Très rapidement après la perception du signal, des échanges de flux d'ions s'opèrent de part et d'autre des membranes des cellules, comme un influx d'ions Ca^{2+} et un échange d'ions K^+/H^+ au niveau des membranes plasmiques (Atkinson *et al.*, 1985, 1990). L'acidification du pH extracellulaire par inhibition de l'entrée des ions H^+ à travers les membranes permet de lutter

contre la prolifération de bactéries en surface des cellules (Tripathy *et al.*, 2003). Suite à ces échanges ioniques, un « burst oxydatif », c'est-à-dire une augmentation de la quantité des espèces réactives de l'oxygène (ROS), est observé au site d'infection (Levine *et al.*, 1997 ; Lamb et Dixon, 1997 ; Alvarez *et al.*, 1998) ainsi que des modifications du niveau de phosphorylation de différentes protéines (Grab *et al.*, 1989 ; Xing *et al.*, 1996 ; Adam *et al.*, 1997). Il a été supposé que les ROS, issus du « burst oxydatif », ne soient pas impliquées dans la mort des cellules par des dommages directs comme la peroxydation des lipides (Rusterucci *et al.*, 1999). Ces ROS pourraient intervenir, du fait de leur toxicité, dans la lutte contre les agents pathogènes et ils pourraient également contribuer au renforcement de la paroi de la cellule végétale pour éviter la propagation de l'agent infectieux (Brisson *et al.*, 1994 ; Tenhaken *et al.*, 1995). La peroxydation des lipides catalysée par les lipoxygénases comme la 9-LOX pourrait entraîner la mort cellulaire (HR) permettant ainsi d'éviter la propagation du pathogène (Rosahl, 1996 ; Rancé *et al.*, 1998 ; Rusterucci *et al.*, 1999 ; Cacas *et al.*, 2005, Montillet *et al.*, 2005). Ces premières réponses constituent ce que l'on appelle les réponses « courtes » ou encore « précoces » des plantes contre les attaques pathogènes. Après la mise en place de ces réponses, il est possible d'observer, dans un second temps, l'activation de gènes de défense (Cramer *et al.*, 1985 ; Jabs *et al.*, 1997 ; Chamnongpol *et al.*, 1998, Lyou *et al.*, 2009). L'activation de ces gènes de défense constitue les réponses « tardives » de la plante. Parmi les gènes induits lors d'attaques pathogènes, celui de la phenylalanine ammonia lyase (PAL) est l'un des plus étudiés (Dixon et Paiva, 1995 ; Douglas, 1996 ; Reichert *et al.*, 2009). Ce gène code pour une enzyme qui régule le métabolisme des phénylpropanoïdes impliqués dans les voies de défense des plantes lors d'attaques pathogènes. Effectivement une synthèse de phénylpropanoïdes est nécessaire à la synthèse de l'acide salicylique qui permet à la plante infectée de développer une immunité après l'infection (La Camera *et al.*, 2004). Le gène de la PAL est d'ailleurs également activé après une induction avec de l'éthylène ou de l'acide jasmonique, connus pour être les acteurs de la réponse des plantes à des d'attaques pathogènes (Enyedi *et al.*, 1992, Bari et Jones, 2009).

b. Effet du NAE-14:0 dans la mise en place des réponses de défense lors d'attaques pathogènes

La xylanase est un éliciteur de nature protéique provenant de *Trichoderma viride*. Lorsqu'elle se fixe sur un récepteur présent à la surface des membranes (Hanania et Avni, 1997), elle induit une augmentation de la synthèse des NAE rapidement suivie par leur hydrolyse par différentes PLD (β ou γ) (Chapman *et al.*, 1998). Les NAE ainsi formées, comme le NAE-14:0, sont alors excrétées et peuvent se fixer à des récepteurs de type CB-

like pour la mise en place des réponses de défense des plantes aux attaques pathogènes (Tripathy *et al.*, 2003). L'ajout d'une faible concentration (mM) de NAE (12:0, 14:0, 16:0, 18:0 et 18:1) dans des cultures de cellules de tabac traitées à la xylanase induit une inhibition de l'alcalinisation du milieu (figure II-9) en arrêtant l'entrée des ions H^+ dans la cellule. Comme nous l'avons précisé plus haut, cette acidification du milieu permet de lutter contre le développement des pathogènes.

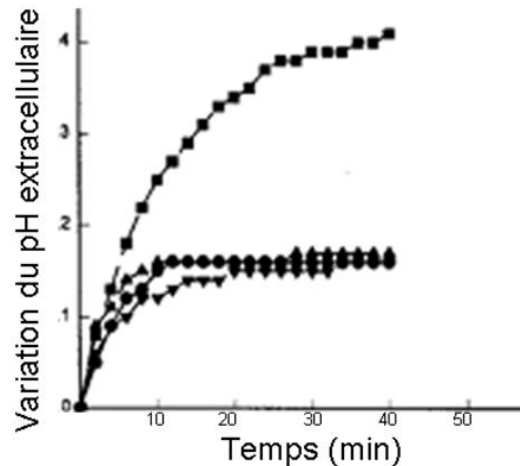


Figure II-9. Effets d'ajout du NAE-14:0 (0,1mM) sur l'alcalinisation du milieu de culture de cellules de tabac induites à la xylanase ($1\mu g.ml^{-1}$). B, ■ xylanase, ▲ xylanase plus NAE14:0, ▼ NAE14:0, ● contrôle (Tripathy *et al.*, 1999).

Le développement de différents pathogènes (*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (*P.s. tomato*) et *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*P.s. maculicola*)) a été suivi après inoculation de plantes surexprimant ou KO pour une enzyme de la voie de dégradation des NAE : une FAAH. Les résultats ont montré que le développement bactérien était plus important dans les plantes contenant moins de NAE que dans les plantes témoins (figure II-10), confirmant ainsi l'implication des NAE dans les réponses précoces de la plantes contre les attaques pathogènes (Kang *et al.*, 2008).

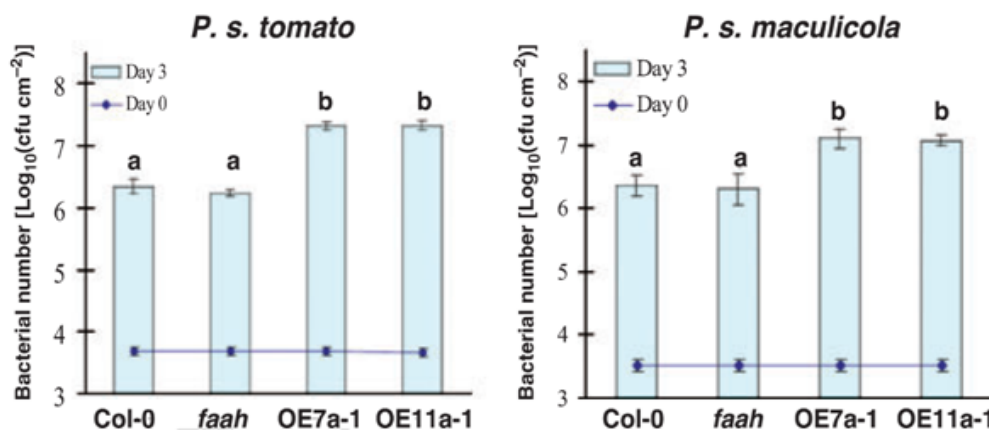


Figure II-10. Effet du niveau de transcription de la fatty acid amide hydrolase (At5g64440) sur le nombre de bactéries présentes au niveau de la zone d'inoculation du pathogène sur la feuille d'*A. thaliana*. faah, mutant KO pour la fatty acid amide hydrolase ; OE, lignée surexprimant la fatty acid amide hydrolase ; Col0, contrôle (Kang *et al.*, 2008).

Par ailleurs, il a été aussi montré que le NAE-14:0 peut induire des réponses tardives comme l'expression du gène PAL. (Figure II-11).

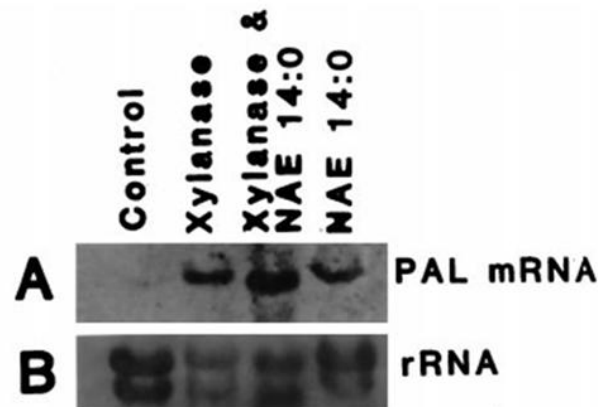


Figure II-11: Analyse de l'expression du transcrit de la PAL de feuilles de tabac. A; Line 1: contrôle, ligne 2: traitement à la xylanase, ligne3: traitement à la xylanase et à la NAE-14:0, ligne 4 traitement à la NAE-14:0. B; contrôle du chargement du gel (Tripathy *et al.*, 1999).

L'implication de ces lipides (NAE) dans la mise en place des réponses tardives de la plante face aux attaques pathogènes a été confirmée à partir de plantes surexprimant la FAAH végétale. Chez ces plantes, ayant une teneur moindre en NAE, 64 gènes ont un niveau de transcrit réduit. Il s'agit de gènes codant pour des protéines avec des motifs riches en LRR (leucine riche repeat), ou avec des motifs TIR/CC (Toll and interleukin-1 receptor/coiled coil), ou encore avec des sites de fixation nucléotidique (NBS), caractéristiques des protéines de résistance aux attaques pathogènes. Le gène codant pour la PAL fait partie de ces gènes réprimés (De young et Innes, 2006, Kang *et al.*, 2008).

2.3.2.2 Interactions NAE/Phospholipase D

Chez les plantes, il existe 5 isoformes actives des PLD : α , β , γ , δ , ζ dont les propriétés biochimiques diffèrent les unes des autres (Qin *et al.*, 1997 ; Wang, 2005). La PLD α par exemple, requiert une concentration de l'ordre du millimolaire en Ca^{2+} pour être activée alors que les isoformes β et γ nécessitent une concentration de l'ordre du micromolaire pour une activité optimale (Pappan *et al.*, 1998). Toutes les PLD peuvent hydrolyser les NAPE en NAE à l'exception de la PLD α qui est inhibée par ces lipides (figure II-12), les inhibitions les plus importantes étant observées avec les NAE-12:0 et NAE-14:0 (Austin-Brown et Chapman, 2002)

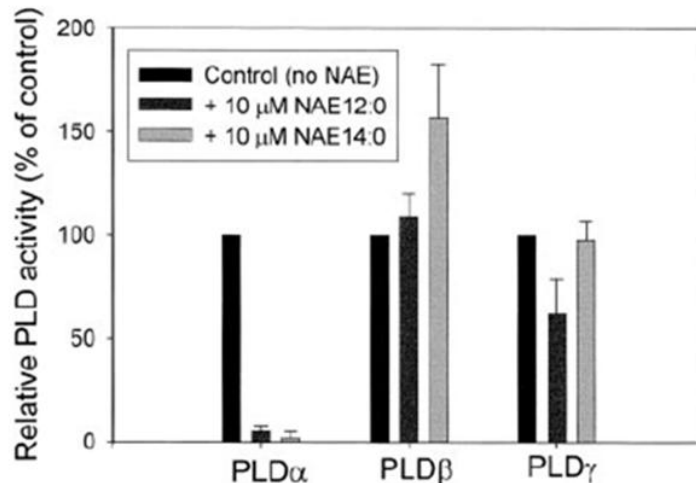


Figure II-12. Comparaison des effets inhibiteurs des NAE-12:0 et NAE-14:0 sur les PLD α , PLD β et PLD γ (Austin-Brown et Chapman, 2002).

Il a aussi été montré que les lysophosphatidyléthanolamines (LPE) inhibent l'activité des PLD α de *Brassica oleracea* (figure II-13) (Ryu *et al.*, 1997). La partie éthanolamine retrouvée chez les NAE semble donc jouer un rôle clef dans la régulation de l'activité des PLD α *in vitro* (Wang, 2001). Cependant l'éthanolamine seule n'a pas d'effet sur ces enzymes. C'est donc une forme mono-acylée plus un groupement éthanolamine (LPE ou NAE) qui semble responsable de l'inhibition des PLD α (avec un effet de la longueur de la chaîne carbonée dans le cas des NAE) (Austin-Brown et Chapman, 2002).

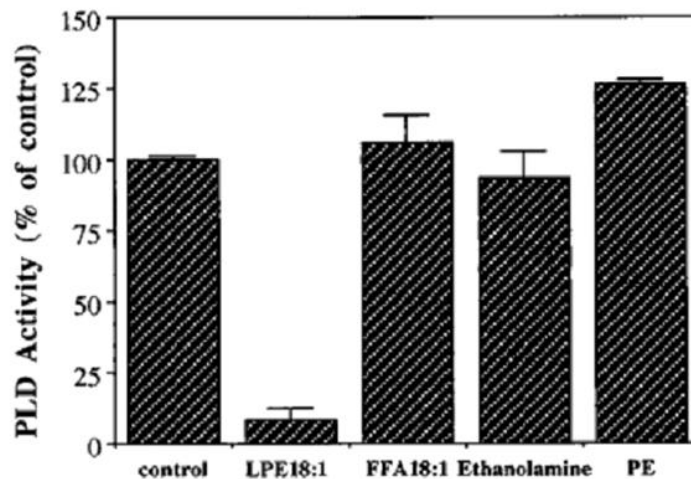


Figure II-13. Etude de l'inhibition de l'activité PLD α de *Brassica oleracea* en présence de différents composés (Ryu *et al.*, 1997).

a. Effet sur la fermeture des stomates chez *A. thaliana*

Les PLD α chez les plantes sont impliquées dans différents processus cellulaires comme la voie de fermeture et d'ouverture des stomates en réponse à l'acide abscissique

(ABA) (Sang *et al.*, 2001). L'application de NAE à la surface des cellules induit une inhibition de la fermeture des stomates (Austin-Brown et Chapman, 2002). Ce phénomène peut s'expliquer par l'inhibition des PLD α qui activent normalement les canaux ioniques modifiant ainsi les pressions osmotiques pour la fermeture des cellules de gardes des stomates (Figure II-14).

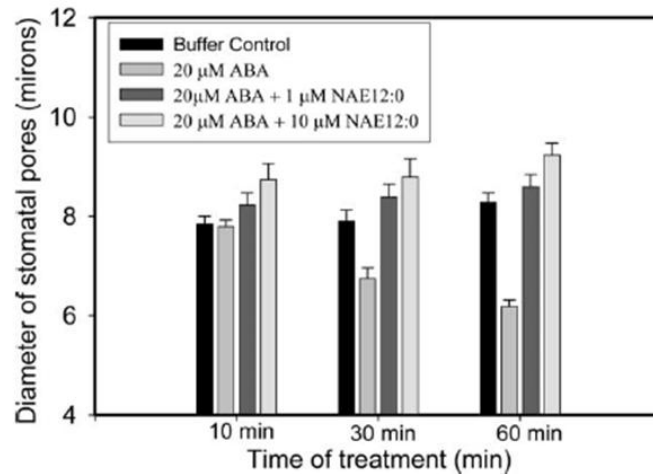


Figure II-14: Représentation de l'inhibition de la fermeture des stomates en réponse à l'ABA en fonction de la concentration en NAE-12:0 (Austin-Brown et Chapman, 2002).

b. Effets sur la germination et le développement des jeunes plantules

Comme nous l'avons exposé plus haut, la quantité de NAPE et de NAE varie beaucoup durant la germination et le développement des jeunes plantules. C'est pourquoi, très tôt, il a été supposé que ces lipides, notamment les NAE, avaient un rôle physiologique dans ces processus (Chapman et Moore 1993b). L'addition de NAE exogènes dans le milieu de culture de plantes d'*Arabidopsis thaliana* réduit le développement racinaire des plantules (surtout celui de la racine principale mais aussi ceux des racines secondaires et des poils racinaires). La NAE à 12 atomes de carbone a été la première NAE à être associée à ces phénotypes (Blancaflor *et al.*, 2003). Plus tard il a été démontré que la NAE-18:2 pouvait également induire ces effets (Wang *et al.*, 2006). Cette diminution de la taille racinaire en présence de NAE est due à un élargissement de la racine au niveau de l'apex (Figure II-15). Dans cette zone, les cellules sont plus larges et distordues avec des invaginations anormales au niveau des membranes plasmiques. Ces cellules présentent également un nombre élevé de vésicules en périphérie, et leurs parois sont très souvent incomplètes (Blancaflor *et al.*, 2003). De plus, il est possible d'observer dans cette zone de la racine de plantes traitées au NAE-12:0, une désorganisation des endomembranes, la présence d'agrégats de corps fusiformes et un trafic vésiculaire ralenti (Blancaflor *et al.*, 2003).

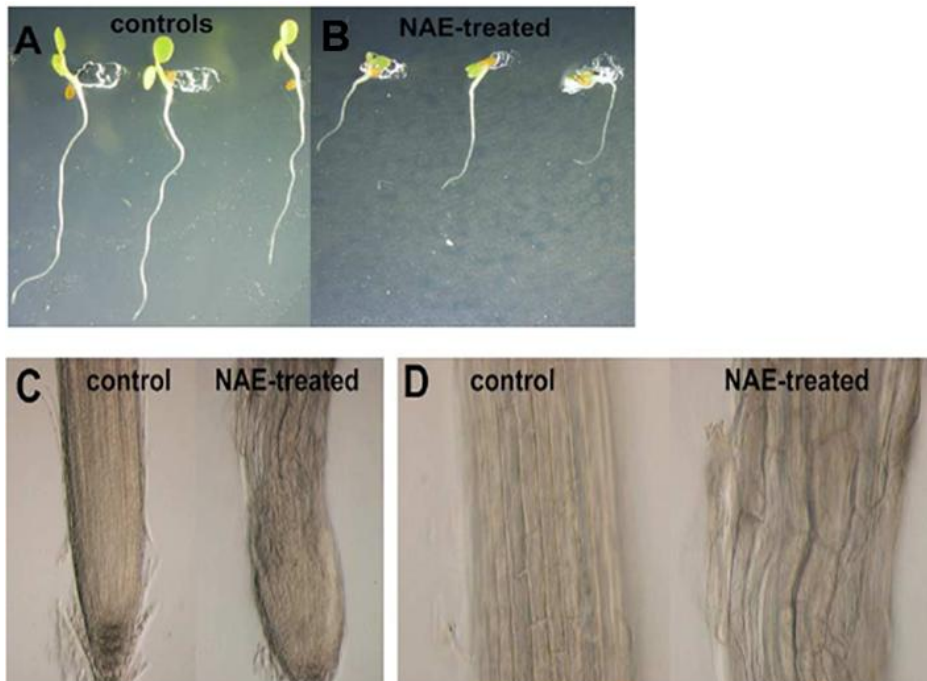


Figure II-15. Effet du NAE-12:0 sur le développement de la racine principale chez *A. thaliana*. A, culture sans NAE-12:0 ; B, culture en présence de NAE-12:0 ; C, agrandissement de la pointe de la racine principale ; D, agrandissement sur la zone « élargie » de la racine principale (Blancaflor *et al.*, 2003).

Toutes ces observations suggèrent une désorganisation des microtubules et du cytosquelette d'actine (Motes *et al.*, 2005) provoquée par l'inhibition des PLD α et probablement des PLD ζ qui interviennent dans la formation du cytosquelette d'actine des cellules du chevelu racinaire (Ohashi *et al.*, 2003). En effet, ces enzymes sont impliquées dans les interactions microtubules/membranes (Gardiner *et al.*, 2001), et leur inhibition par du 1-butanol conduit aux mêmes phénotypes que ceux observés en présence de NAE12:0 exogène (Motes *et al.*, 2005). Cependant les effets du 1-butanol sur la germination des graines, le développement des jeunes plantules, la division cellulaire et l'organisation du cytosquelette sont plus prononcés que ceux observés avec le NAE-12:0 (Motes *et al.*, 2005). Cette différence d'intensité des phénotypes observés en présence de 1-butanol ou de NAE-12:0 s'accompagne d'une différence de sélectivité d'inhibition des PLD par ces deux types de molécules : le 1-butanol est considéré comme un inhibiteur aspécifique des PLD tandis que les NAE inhibent spécifiquement les PLD α et probablement les PLD ζ .

Les différents effets du NAE-12:0 sur de jeunes plantules d'*Arabidopsis thaliana* ont été confirmés chez des plantes surexprimant, ou KO pour le gène de la FAAH At5g64440. Les plantes exprimant de façon constitutive ce gène ont un niveau de NAE endogènes plus faible que les plantes Col0 (Wang *et al.*, 2006). Cette réduction s'accompagne d'une accélération du développement des jeunes plantules ainsi que d'une formation de cotylédons

plus larges que ceux des plantes Col0. De plus les plantes qui surexpriment la FAAH végétale sont moins sensibles aux effets de l'application de NAE exogènes sur le développement des jeunes plantules. Au contraire, les plantes KO pour ce gène, sans phénotype évident de développement, ont une croissance plus sensible à la présence de NAE (Wang *et al.*, 2006).

c. Effet des NAE sur le ralentissement de la chute des fleurs chez *Dianthus caryophyllus*

La sénescence des fleurs est associée à la perte de perméabilité des membranes suivie d'une fuite d'ions dérégulant diverses enzymes comme les PLD α . Les fuites d'ions observées durant la sénescence des fleurs engendrent une augmentation de la peroxydation des lipides, ce qui accélère la déstabilisation de la bicouche lipidique (Frag et Palta, 1993). Durant la sénescence des fleurs, une augmentation de ROS ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 etc.) est observée. Ces espèces réactives de l'oxygène induisent non seulement la peroxydation de lipides mais également la dé-acylation des phospholipides (Kellogg et Fridovich, 1975). Diverses enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), l'ascorbate peroxydase (APX), ou encore la glutathione réductase (GSH) interviennent dans les voies anti-oxydantes présentes chez les plantes en permettant de dégrader les molécules dérivées des anions superoxydes.

Le traitement de fleurs de *Dianthus caryophyllus* pendant 12 jours avec du NAE-12:0 provoque un retard de la peroxydation des lipides (Zhang *et al.*, 2007) et une diminution de la fuite des ions au niveau des membranes, et donc probablement un retard de l'activation des PLD α impliquées dans les voies de la sénescence des feuilles et des fleurs (Frag et Palta, 1993). Durant ce même traitement, la quantité des ROS produites est réduite grâce à l'augmentation de l'activité des enzymes impliquées dans les voies anti-oxydantes (CAT, SOD, APX) (figure II-16).

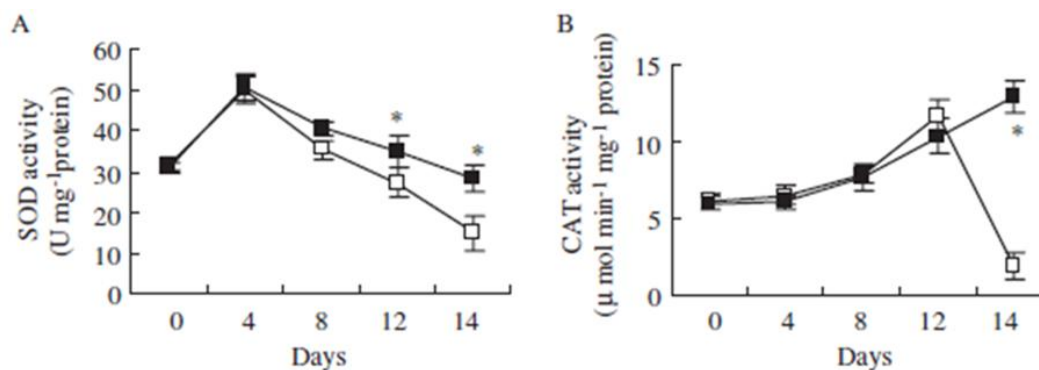


Figure II-16. Effet de l'application de NAE-12:0 sur l'activité de la superoxyde dismutase (A) et de la catalase (B) chez *Dianthus Caryophyllus* (Zhang *et al.*, 2006). (■) en présence de NAE-12:0 ; (□) contrôle.

Cette diminution de la quantité de ROS ainsi que de la diminution de la fuite des ions et de la peroxydation de lipides s'accompagnent d'un retard significatif de la sénescence des fleurs chez le modèle *Dianthus caryophyllus* (Zhang *et al.*, 2006).

2.3.2.3 Interactions NAE/acide abscissique dans le développement des plantules d'*A. thaliana*

Comme nous l'avons vu, les NAE comme les NAE-12:0 et les NAE-18:2, peuvent inhiber la croissance de jeunes plantules d'*A. thaliana*. De la même façon l'ABA est connu pour être un régulateur négatif du développement des jeunes plantules (Lopez-Molina *et al.*, 2002 ; Blancaflor *et al.*, 2003 ; Motes *et al.*, 2005). Ces deux composés, NAE et ABA, sont tous deux présents dans les graines au début de l'imbibition et leurs concentrations diminuent durant la germination et la croissance de la plantule d'une façon similaire (Chapman *et al.*, 1999 ; Jacobsen *et al.*, 2002 ; Nakabayashi *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2006). Leurs actions sur le développement des jeunes plantules sont probablement corrélées car les plantes surexprimant la FAAH sont hypersensibles à la présence d'ABA (0,1 μ M) alors que des plantes insensibles à l'ABA comme les mutants *abi1-1*, *abi2-1* et *abi3-1* (ABI, ABA insensitive) ne montrent pas de sensibilité à l'ajout de NAE exogènes dans le milieu de culture (figure II-17) (Teaster *et al.*, 2007).

De plus l'application de NAE-12:0 dans le milieu de culture est responsable d'une augmentation du nombre de transcrit du gène *ABI3*, un gène clé pour la régulation du développement et la maturation de l'embryon des plantes. En conditions physiologiques, son taux de transcrit décroît rapidement au cours de l'imbibition et de la germination (Finkelstein *et al.*, 2002, Nambara et Marion-Poll, 2005 ; Bassel *et al.*, 2006). L'application de NAE augmente le taux et la fenêtre d'expression de ce transcrit après l'imbibition, ce qui entraîne une augmentation de l'expression de gènes de réponse à l'ABA comme, *ATEM1*, *AtHVA22B*, *CRA1* etc. (Teaster *et al.*, 2007).

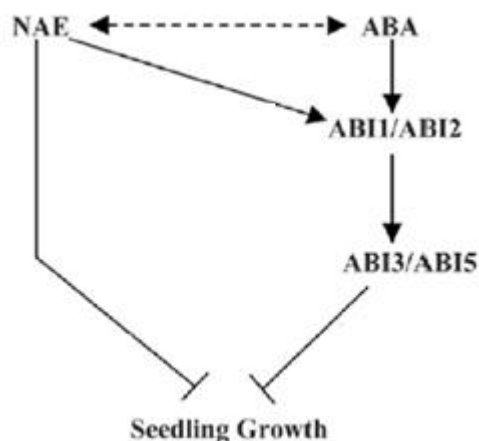


Figure II-17. Représentation des interactions supposées des N-acyléthanolamines avec l'acide abscissique dans le développement des jeunes plantules d'*A. thaliana* (Teaster *et al.*, 2007). ABA, acide abscissique ; ABI1/2/3/5, ABA insensitive 1/2/3/5 ; FAAH, fatty acid amide hydrolase ; NAE, N-acyléthanolamine.

En résumé, les NAE sont impliquées dans différents processus cellulaires chez les plantes comme l'inhibition des PLD α (intervenant par exemple dans les voies d'ouverture et de fermeture des stomates), l'inhibition de la germination et le développement des jeunes plantules, mais également dans la sénescence des fleurs ou encore dans l'activation des voies de défense des plantes en réponse aux attaques pathogènes.

3 Métabolisme des N-Acyléthanolamines et de leurs précurseurs

L'existence d'une voie métabolique NAPE/NAE a été démontrée chez les plantes et les mammifères, notamment grâce à l'utilisation de molécules radiomarquées. Ainsi chez les animaux, c'est en ajoutant du H₂¹⁸O dans le milieu de culture de cellules de macrophages de souris que l'existence d'une voie métabolique PE→NAPE→NAE→FFA + éthanolamine (Kuwaie *et al.*, 1990 ; 1997 et 1999) a été mise en évidence. De la même manière chez les plantes, des expériences avec des cellules de tabac cultivées en présence d' [¹⁴C]-éthanolamine ont montré que la synthèse de NAPE est réalisée à partir de PE (Chapman *et al.*, 1995).

3.1 Synthèse de NAPE chez les animaux

Nous ne disposons que de peu d'informations sur l' (ou les) enzyme(s) responsable(s) de la synthèse de NAPE chez les animaux (pour revue Wang et Ueda, 2009). Notons ici que l'activité NAPE-synthase est également appelée activité « NAT » (pour N-acyltransférase) dans la bibliographie relative aux cellules animales.

3.1.1 L'activité NAPE-synthase Ca²⁺ dépendante

L'enzyme responsable de la synthèse des NAPE animales est une protéine membranaire dont l'activité a été mesurée dans plusieurs tissus et cellules, ainsi que dans plusieurs fractions subcellulaires comme le réticulum endoplasmique (RE) et les mitochondries (Natarajan *et al.*, 1982). L'activité NAPE-synthase chez le rat est la plus importante dans le cerveau, plus précisément dans le tronc cérébral, puis dans les testicules et les muscles, et est plus faible dans les autres organes (Cadas *et al.*, 1997). De plus elle semble varier au cours du développement puisque dans les cerveaux de jeunes rats, elle est supérieure à celle mesurée dans des cerveaux de rats adultes (Natarajan *et al.*, 1986 ; Moesgaard *et al.*, 2000). Il existe aussi une spécificité tissulaire de l'activité NAPE synthase

en fonction des organismes étudiés. Par exemple, cette activité a été mesurée dans le cœur de *Canis familiaris* alors qu'elle est absente dans ce même organe chez le rat (Cadas *et al.*, 1997).

Des expériences de pulse avec de l'[1-2,¹⁴C]-éthanolamine ont permis de clairement établir que la PE est le précurseur des NAPE, des N-lyso-PE (N-acyl-lysophosphatidyléthanolamine) et des NAE en présence d'ions Ca^{2+} . Ni les acides gras, ni les acyl-CoA, ne sont utilisés en tant que donneurs d'acyles pour la synthèse de NAPE chez les animaux (Natarajan *et al.*, 1982). *A contrario*, PE, PC, leurs dérivés lysolipides et les CL sont des donneurs d'acyles pour cette synthèse (Schmid *et al.*, 1990 ; Cadas *et al.*, 1997 ; Sugiura *et al.*, 1996a). La synthèse de NAPE correspond donc à un transfert d'une chaîne d'acyle en position *sn1* d'un phospholipide sur la position amine de la PE (figure II-18). Aucune spécificité en fonction de la longueur de chaîne ou du degré d'insaturation n'a été mise en évidence pour cette enzyme (Sugiura *et al.*, 1996b).

Bien que les premières tentatives de solubilisation de la NAPE-synthase animale ou de reconstitution du système de transacylation aient échoué, une caractérisation partielle de l'enzyme a été possible en utilisant des extraits bruts de membranes. La protéine catalysant la synthèse de NAPE est une protéine thermosensible qui est activée par les ions Ca^{2+} (Natarajan *et al.*, 1982 ; Schmid *et al.*, 1990 ; Di Marzo *et al.*, 1994 ; Cadas *et al.*, 1996). Les ions Mn^{2+} et Sr^{2+} peuvent se substituer au Ca^{2+} dans les mêmes concentrations (5mM) et produire les mêmes espèces moléculaires de NAPE (Reddy *et al.*, 1984). La protéine kinase C ne semble pas intervenir dans l'activation de cette protéine, en revanche les AMP cycliques pourraient moduler la synthèse de NAPE (Cadas *et al.*, 1996).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la synthèse de NAPE est généralement observée dans des tissus lésés comme par exemple lors d'une attaque cardiaque. Lorsque les tissus sont endommagés, il est possible d'observer une dérégulation du contrôle de l'homéostasie des ions Ca^{2+} . Cette dérégulation est peut-être à l'origine de l'accumulation de NAPE, N-Lyso-PE et de NAE dans ces tissus (Epps *et al.*, 1979, 1980).

3.1.2 L'activité NAPE-synthase Ca^{2+} indépendante

La LRAT (Lecithin retinol acyl-transferase) est une enzyme qui catalyse le transfert d'un groupement acyle à partir de PC sur du rétinol formant un rétinyl ester (figure II-19) (Shi *et al.*, 1993 ; Rando, 2002).

En se basant sur la similarité de réaction entre la LRAT et la NAPE-synthase, il a été suggéré que la structure primaire de la NAPE-synthase devait être homologue à celle de la LRAT.

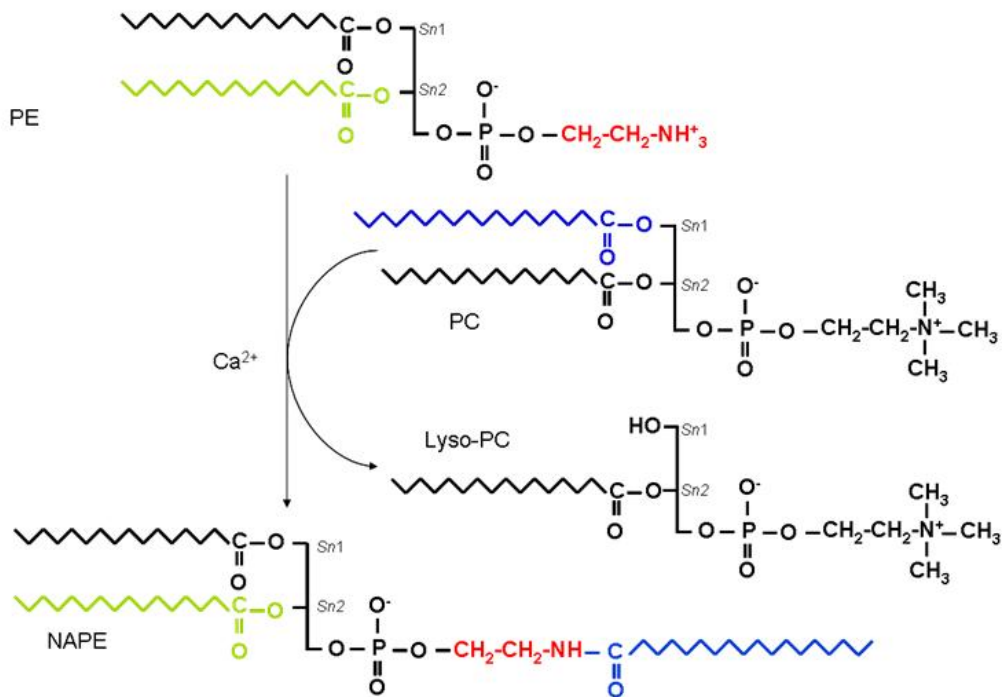


Figure II-18. Réaction de synthèse de NAPE à partir de PE (accepteur d'acyle) et de PC (donneur d'acyle) via une N-acylphosphatidyléthanolamine synthase Ca^{2+} -dépendante. Lyso-PC, Lyso-phosphatidylcholine ; NAPE, N-acylphosphatidyléthanolamine ; PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidyléthanolamine.

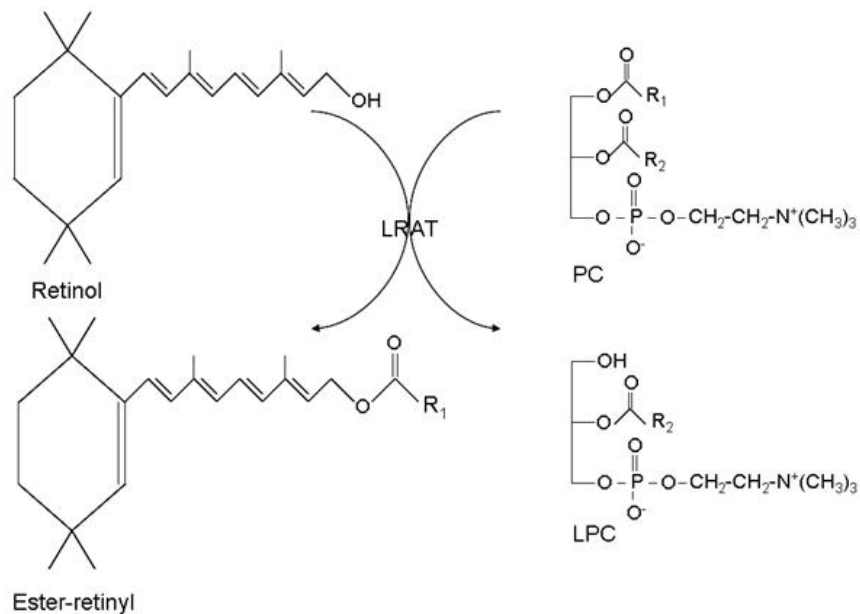


Figure II-19. Réaction d'acylation du rétinol en rétinyl ester via une lecithin rétinol acyl-transférase (LRAT). LPC, lyso-phosphatidylcholine ; PC, phosphatidylcholine, R_1 et R_2 , chaîne acyle.

Plusieurs protéines homologues ont ainsi été identifiées à partir de la séquence de la LRAT, dont la protéine RLP-1 qui s'est avérée être la seule à posséder une activité NAPE-synthase (Jin *et al.*, 2007 ; Okamoto *et al.*, 2007). Cependant, de nombreuses différences existent entre l'activité de la protéine RLP1 et l'activité NAPE-synthase décrite précédemment. Premièrement, la protéine RLP1 présente une activité Ca^{2+} -indépendante alors que l'activité NAPE-synthase déjà décrite est Ca^{2+} -dépendante. De plus l'activité de la protéine RLP-1 est mesurée au niveau des fractions cytosoliques alors que l'activité NAPE-synthase Ca^{2+} -dépendante est associée aux membranes. Comme nous l'avons vu précédemment, la NAPE-synthase de mammifères est spécifique de la position *sn1* des différents phospholipides utilisés comme donneurs d'acyles alors que la protéine RLP-1 peut transférer un groupement acyle quelque soit sa position sur le phospholipide (Jin *et al.*, 2007). De plus, l'activité NAPE-synthase est inactivée par l'éthylène-diaminetetraacetic acid (EDTA), ce qui n'est pas le cas de l'activité de la protéine RLP-1. Enfin, cette enzyme peut non seulement acyler de la PE mais elle peut également catalyser la réaction de transfert de groupements acyles sur différents lysophospholipides et catalyse également la réaction d'hydrolyse en position *sn1* et *sn2* de différents phospholipides comme les $\text{PLA}_1/\text{PLA}_2$ (phospholipase $\text{A}_{1/2}$) (Jin *et al.*, 2007).

D'après les auteurs, la protéine RLP1 n'est probablement donc pas l'enzyme qui catalyse la synthèse de NAPE chez les animaux.

3.2 Synthèse de NAPE chez les plantes

Chez les plantes, aucun gène codant pour une NAPE synthase n'a été jusqu'à présent cloné. Au début des années 1990, des expériences réalisées sur des graines de coton (*Gossypium hirsutum* L.) ont permis de mettre en évidence la synthèse de NAPE à partir de PE et d'acides gras libres (figure II-20) (Chapman et Moore, 1993a ; Sandoval *et al.*, 1995). La PE peut être obtenue par plusieurs voies de synthèse : la voie nucléotidique (Kennedy et Weiss, 1956) ou la voie d'échange (Tijburg *et al.*, 1989 ; Arthur et Page, 1991 ; Wang et Moore, 1991). Quelque soit sa voie de synthèse, ce phospholipide peut servir de précurseur à la synthèse de NAPE.

L'activité NAPE synthase observée chez les plantes est très différente de celle décrite chez les mammifères. Pour Chapman et Moore, chez les plantes, la synthèse de NAPE résulte de l'acylation d'une PE au niveau de la fonction amine, avec un acide gras libre (Chapman et Moore 1993b). L'acylation de la PE avec un acide gras libre comme l' $[\text{C}^{14}]$ -acide palmitique est d'après leur travaux 200 fois plus importante qu'avec la forme activée de cet acide gras ($[\text{C}^{14}]$ -palmitoyl-CoA) ou encore avec le substrat $[\text{C}^{14}]$ -dipalmitoyl-PC. La faible quantité de NAPE synthétisée en présence de palmitoyl-CoA ou de PC est

attribuée à l'hydrolyse de ces composés (via une activité hydrolase), qui produit des acides gras libres utilisés pour la synthèse de NAPE (figure II-20).

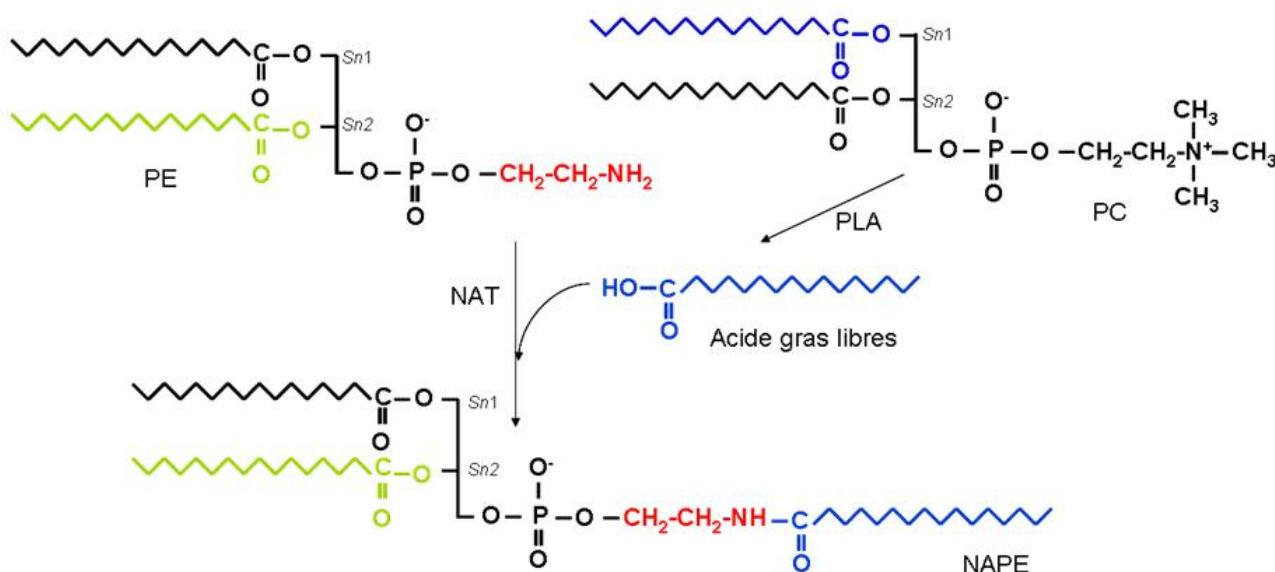


Figure II-20. Représentation de la voie de synthèse de N-acylphosphatidyléthanolamine (NAPE) chez les plantes. PC, phosphatidylcholine ; PE, phosphatidyléthanolamine ; PLA, phospholipase A.

Les conditions expérimentales « optimales » pour mesurer l'activité NAPE synthase, comme la température et le pH (45°C, pH8), ont été déterminées *in vitro* en utilisant des microsomes de coton comme source d'enzyme (Chapman et Moore, 1993b). La vitesse de synthèse de NAPE augmente progressivement en fonction de la concentration en [¹⁴C]-acide palmitique selon une courbe cinétique biphasique (Chapman et Moore 1993b). D'après les auteurs, il y aurait donc deux sites de fixation du substrat, l'un avec une forte affinité ($K_M=7,2\mu\text{M}$, $V_{\max}=18,8\text{nmol.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines) et l'autre avec une plus faible affinité ($K_M=32\mu\text{M}$, $V_{\max}=44,9\text{nmol.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines). L'acide palmitique (C16:0), qui est l'acide le plus abondant en position amine des NAPE de plantes, se fixe au niveau des deux sites. En revanche l'acide stéarique (C18:0), le second composé le plus abondant en position amine des NAPE chez *Gossypium hirsutum* L., se fixe sur le site de haute affinité et très peu sur le site de faible affinité. L'acide oléique (C18:1) et l'acide myristique (C14:0) ne peuvent se fixer que sur le site de haute affinité, et ne rentrent pas en compétition avec les substrats se fixant sur le site de faible affinité (Chapman et Moore, 1993b).

Cette réaction d'acylation de la PE en NAPE catalysée par des microsomes de coton ne nécessite pas d'ATP ni d'autres cofacteurs (Chapman *et al.*, 1995). Cependant cette synthèse est activée par la présence d'ions: HPO_4^{2-} , HCO_3^- , SO_4^{2-} , de NADPH alors qu'elle est inhibée par les ions Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , par l'ATP, l'ADP et la flavine adénine dinucléotidique ou mononucléotidique. Les autres nucléotides triphosphates comme la

guanosine triphosphate (GTP), la cytidine triphosphate (CTP) et la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD, NADH) ne modifient pas l'activité NAPE synthase du coton (Chapman et Moore, 1993b).

La synthèse de NAPE chez le coton (*Gossypium hirsutum*. L) semble localisée essentiellement au niveau du RE, et dans une moindre mesure au niveau du Golgi et de la membrane plasmique. Cependant l'activité mesurée dans les membranes du plasmalemma et du Golgi pourrait résulter d'une contamination par des membranes du RE. Ainsi il est possible qu'aucune activité NAPE synthase « acide gras dépendante » ne soit présente dans le Golgi et la membrane plasmique. Par ailleurs, aucune activité NAPE synthase « acide gras-dépendante » n'a été associée aux mitochondries, aux plastides, aux peroxysomes, ni à la fraction cytoplasmique des cellules (Chapman et Sriparameswaran, 1997).

Une tentative de purification de l'enzyme catalysant la synthèse de NAPE chez les plantes a été réalisée *via* l'utilisation de colonne IAM (Immobilized Artificial Membrane) possédant une monocouche de PE (C3:0/C10:0) (^{ether}IAM.PE^{C3/C10}). Cette colonne permet, en théorie, de fixer toutes les protéines ayant une affinité pour la PE. Après élution en présence de DMPE (DiMyristoylPhosphatidylEthanolamine) et de DDM (n-Dodecyl-β-D-maltoside), un polypeptide de 64KDa possédant une activité NAPE synthase a été partiellement purifié (Cai *et al.*, 1995). En utilisant de cette fraction purifiée comme source d'enzymes, le mécanisme de synthèse de la NAPE a été approfondi. Comme lors des essais sur microsomes, l'enzyme partiellement purifiée utilise un acide gras libre comme donneur d'acyle. De plus l'utilisation d'inhibiteurs « acide aminé spécifique » a permis d'identifier une sérine responsable de la formation d'un intermédiaire enzyme-acide gras libre (McAndrew et Chapman, 1998).

La création d'une liaison amide nécessite 21kcal.mol⁻¹. Il faut donc en théorie un apport énergétique pour palier le fait que le donneur d'acyle ne soit pas sous une forme activée (acyl-CoA, acyl-ACP). Cependant aucun couplage réactionnel n'a été associé à la synthèse de NAPE. D'après les auteurs, l'existence d'un gradient de proton entretenu par la NADPH pourrait permettre la création d'un potentiel de membrane utilisé pour la synthèse de NAPE ou encore cette synthèse de NAPE pourrait être liée au mode d'action encore inconnu des ions HPO₄²⁻, HCO₃⁻, SO₄²⁻. Cependant la synthèse de NAPE mesurée à partir des protéines partiellement purifiées sur colonne, montre que l'apport énergétique nécessaire à la réaction n'est pas due à un potentiel de membrane ou à la présence de certains ions dans le mélange réactionnel (Cai *et al.*, 1995). D'après les auteurs, les interactions hydrophobes entre les différents substrats (acide gras libre et PE) et l'enzyme pourraient diminuer l'énergie nécessaire pour passer l'état de transition de la réaction et permettre la synthèse de NAPE sans aucun apport énergétique.

La formation de NAPE dans les cellules animales est très différente de celle étudiée chez les plantes. Chez les animaux, la NAPE est synthétisée par une réaction de transacylation d'un groupement acyle en position *sn1* d'un phospholipide (exemple PC) sur le groupement amine d'une PE. Il s'agit d'un échange intermoléculaire sans la synthèse d'intermédiaire comme un acide gras libre ou un acyl-CoA. Chez les plantes, cette synthèse semble résulter d'un transfert d'un acide gras libre sur la fonction amine d'une PE. Aucun phospholipide ou acyl activé comme les acyl-CoA n'ont été jusqu'à présent identifiés comme substrat de cette synthèse.

3.3 Synthèse des NAE

3.3.1 Chez l'animal

3.3.1.1 Synthèse de NAE *via* la voie NAPE-PLD

La majorité des NAE synthétisées dans les cellules animales provient de l'hydrolyse des NAPE, réaction catalysée par la NAPE-PLD. Cette PLD appartenant à la famille des zinc metallohydrolases (groupe des β lactamases) se distingue donc des PLD1 et PLD2 qui appartiennent à la famille des HKD phosphodiesterases (Liscovitch *et al.*, 2000 ; Hammond *et al.*, 1995 ; Colley *et al.*, 1997). La NAPE-PLD hydrolyse spécifiquement les NAPE quelle que soit la taille et le degré d'insaturation de la chaîne d'acide gras en position amine de la PE (Schmid *et al.*, 1983 ; Sugiura *et al.*, 1996a,b ; Hillard et Campbell, 1997 ; Di Marzo, 1998 ; Childers et Breivogel, 1998 ; Hansen *et al.*, 1998 ; Mechoulam *et al.*, 1998 ; Randall et Kendall, 1998) (figure II-21).

Cette activité NAPE-PLD est localisée chez le rat dans les organes/tissus ayant une activité NAPE-synthase importante : cerveaux, testicules, tissus lésés. On retrouve également cette activité dans les reins, le foie et la rate. Contrairement à la NAPE-synthase, la NAPE-PLD est toutefois plus active dans les cerveaux de rats adultes que dans les cerveaux de jeunes rats. De façon générale, le cerveau reste l'organe où la NAPE-PLD est la plus exprimée pour différentes espèces (Hansen *et al.*, 2000). En revanche, il existe des variations de l'expression de cette protéine dans d'autres organes en fonction des espèces (Okamoto *et al.*, 2004).

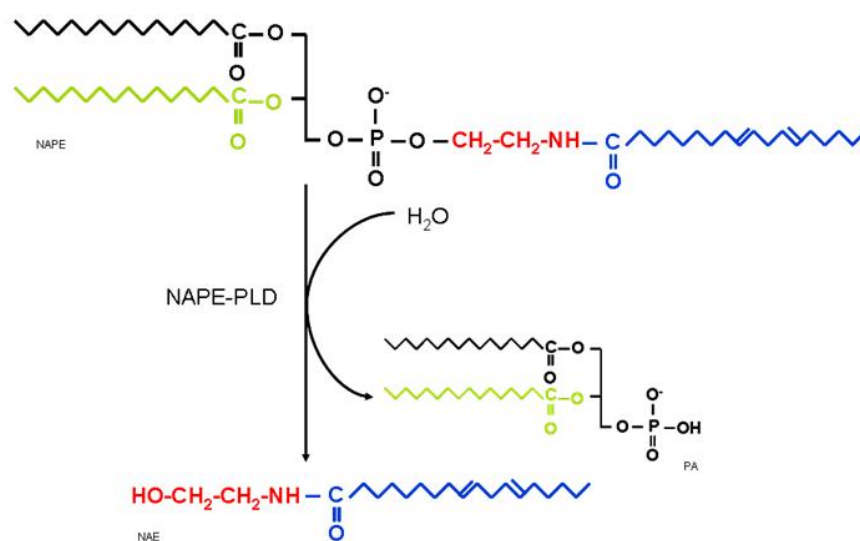


Figure II-21. Voie de synthèse de NAE *via* la NAPE-PLD.

NAPE ; N-acyl-phosphatidyl-éthanolamine, NAE ; N-acyl-éthanolamine ; PA ; acide phosphatidique.

3.3.1.2 Voies alternatives de synthèse des NAE chez les animaux

La voie « NAPE-PLD » est la voie majoritaire chez les animaux mais elle n'est pas la seule. Ainsi, les NAPE peuvent aussi être hydrolysées par des PLA₁/A₂ (Sun *et al.*, 2004) pour former des N-acyl-lyso-PE. Ces composés sont ensuite dégradés en NAE par des enzymes PLD-like (figure II-22). Cette voie complémentaire de la voie NAPE-PLD a été mise en évidence dans différents tissus de rats dont le cerveau (Okamoto *et al.*, 2007).

Une autre voie de synthèse des NAE présente dans les macrophages RAW264.7 stimulés par des lipopolysaccharides (LPS) permet la synthèse de NAE *via* l'action d'une PLC et d'une tyrosine phosphatase (Cohen *et al.*, 1999) (figure II-23). Les PLC clivent les NAPE en DAG et phospho-NAE qui sont à leur tour métabolisés en NAE par l'action d'une phosphatase (Liu *et al.*, 2006).

Enfin une dernière voie de synthèse de NAE a été observée chez des souris transgéniques NAPE-PLD *-/-*, *via* une double déacylation de la NAPE par une sérine hydrolase: la protéine Abh4 (α/β -hydrolase 4). Cette enzyme catalyse la synthèse de GP-NAE (glycérophospho-NAE) qui est lui même hydrolysé par une GDE1 (glycérophosphodiesterase) pour former du NAE et du glycérol (figure II-24) (Simon et Cravatt, 2006, 2008).

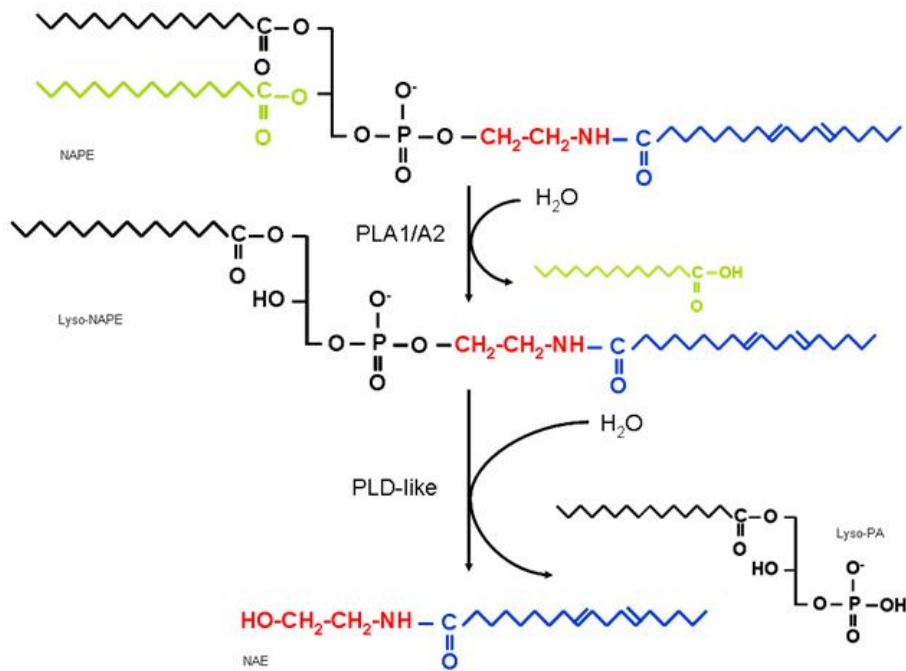


Figure II-22. Voie PLA₁/PLA₂/PLD-like pour la synthèse de NAE chez les animaux. Lyso-PA, acide lysophosphatidique ; PLA₁/PLA₂, phospholipase A₁/A₂ ; PLD-like, phospholipase D-like ; NAE, N-acyléthanolamine ; NAPE, N-acylphosphatidyléthanolamine.

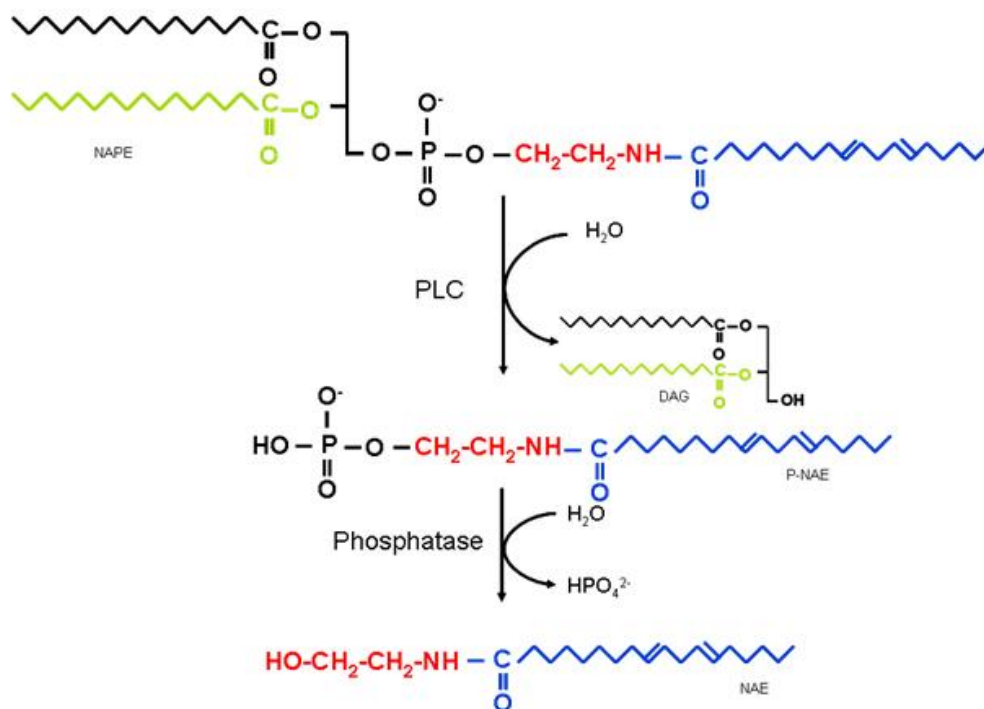


Figure II-23. Voie PLC/phosphatase pour la synthèse de NAE. DAG ; Diacylglycérol ; NAE, N-acyléthanolamine ; NAPE, N-acylphosphatidyléthanolamine ; PLC, phospholipase C ; P-NAE, phospho-N-acyléthanolamine.

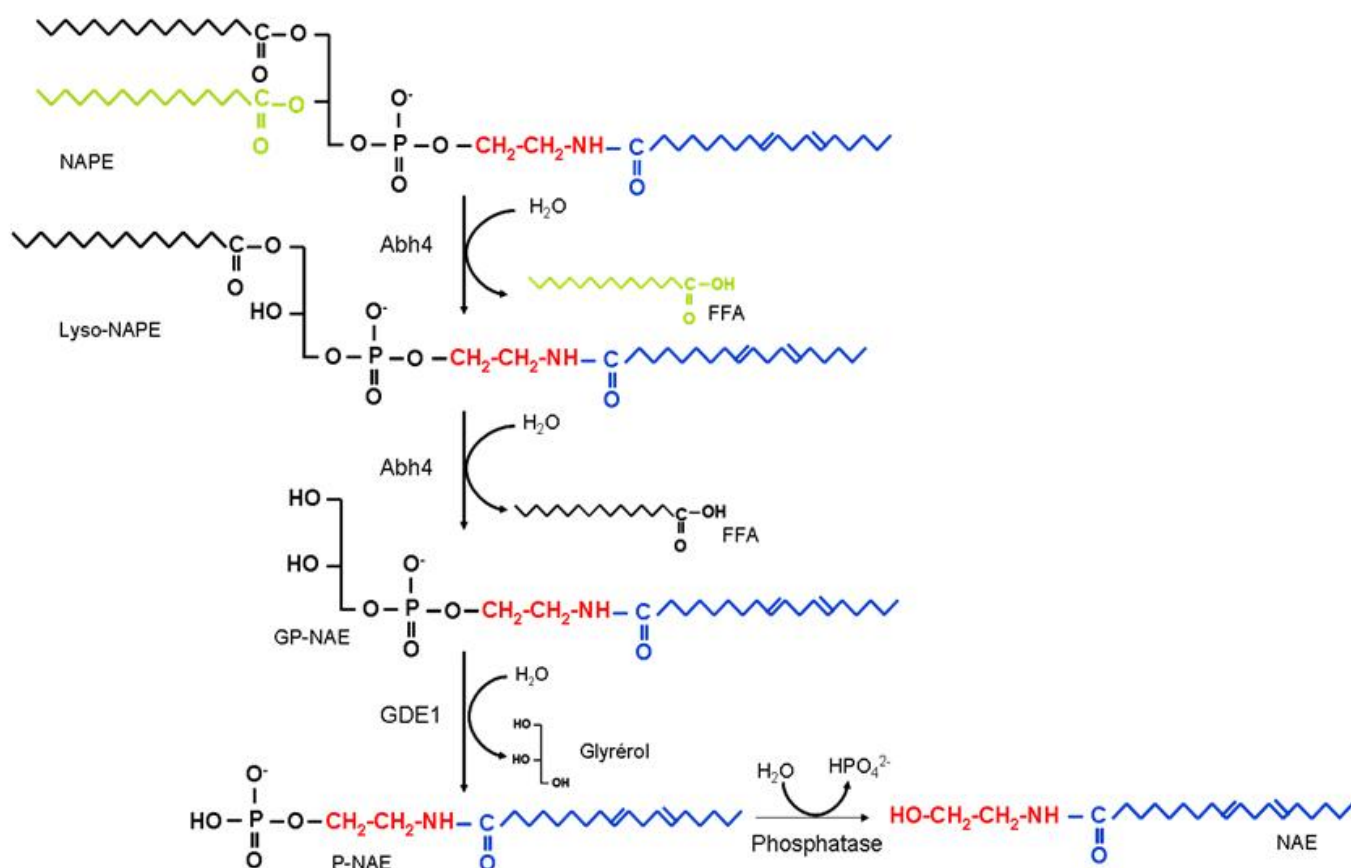


Figure II-24. Voie de synthèse du NAE via une sérine hydrolase: la protéine Abh4 (α/β -hydrolase 4). FFA, acide gras libre (free fatty acid) ; GDE, glycérophosphodiesterase ; Lyso-NAPE, Lyso-N-acylphosphatidylethanolamine ; NAE, N-acyléthanolamine ; NAPE, N-acylphosphatidylethanolamine ; P-NAE, Phospho-N-acyl-éthanolamine.

3.3.2 Synthèse de NAE chez les plantes

La synthèse de NAE chez les plantes est catalysée principalement par l'action de PLD. Il existe 12 gènes codant pour des PLD chez *Arabidopsis thaliana*, PLD qui sont classées en 5 catégories (α , β , γ , δ et ζ) (Wang, 2002). Les expressions hétérologues des PLD α , β et γ chez *E.coli* ont montré que les PLD β hydrolysent à la fois les PC et les NAPE, alors que les PLD γ sont plus spécifiques des NAPE. En revanche, les PLD α qui hydrolysent la plupart des phospholipides (PC, PE, PG) ne clivent pas les NAPE en PA et NAE (Pappan *et al.*, 1998). Chez les plantes, il demeure possible que parmi les différentes PLD (hormis la PLD α), une seule soit spécifiquement impliquée dans l'hydrolyse des NAPE en NAE. Les études tendant à le démontrer restent cependant à être menées.

Les PLD sont souvent activées lors d'attaques pathogènes. Ces attaques peuvent être induites, *in vitro*, par l'ajout d'un éliciteur (comme la xylanase), dans le milieu de culture de cellules de plantes de tabac (*Nicotiana tabacum* L.) (Tripathy *et al.*, 1999). Comme nous l'avons vu précédemment, l'addition de xylanase provoque une augmentation de l'activité

des PLD et de la quantité de NAE. Le mastoparan, petit peptide de 14 acides aminés, est connu, entre autres, pour augmenter l'activité des protéines G (Higashijima *et al.*, 1988). L'ajout de ce peptide dans une préparation de microsomes de tabac active fortement l'hydrolyse des NAPE, *via* une PLD. Ces résultats suggèrent donc l'implication de protéines G dans la régulation de l'activité des PLD impliquées dans l'hydrolyse des NAPE. Cette régulation des PLD par les protéines G est également observée lors d'un déficit hydrique ou durant la germination des graines (Frank *et al.*, 2000 ; Ritchie et Gilroy, 2000).

3.4 Dégradation des NAE

3.4.1 Chez les animaux *via* la Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH)

Comme nous l'avons vu précédemment, les NAE sont des molécules intervenant dans de nombreux processus cellulaires. Afin de mettre fin à leurs effets, la cellule les dégrade grâce à des FAAH qui catalysent leur hydrolyse en acide gras libre et éthanolamine (figure II-25).

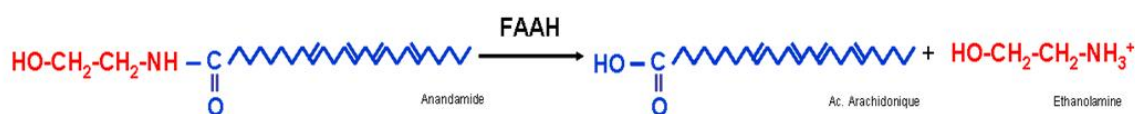


Figure II-25. Réaction de dégradation des NAE *via* une fatty acid amide hydrolase (FAAH).

L'activité d'hydrolyse des NAE a été d'abord étudiée en utilisant des microsomes ou des mitochondries de cellules hépatiques de rat (Schmid *et al.*, 1985). La « N-acyléthanolamine hydrolase » présente dans ces fractions a une forte spécificité pour les N-acyléthanolamines à longues chaînes (C16 et C18), et reste active sur une large gamme de pH et son activité est Ca^{2+} indépendante (Schmid, 2000).

Depuis les travaux de Schmid *et al.* (1985), et consécutivement à la découverte de l'anandamide comme ligand des récepteurs cannabinoïdes (Devane *et al.*, 1992), la dégradation des NAE a été très étudiée (Deutsch et Chin, 1993 ; Koutek *et al.*, 1994 ; Desarnaud *et al.*, 1995 ; Hillard *et al.*, 1995 ; Ueda *et al.*, 1995 ; Maurelli *et al.*, 1995 ; Katayama *et al.*, 1997 ; Omeir *et al.*, 1995 et 1999 ; Cravatt et Lichtman, 2002, Wei *et al.*, 2006).

En 1993, une activité amidase a été mesurée sur des neuroblastes et des cellules cancéreuses (Deutsch et Chin, 1993). Dans ces cellules, l'anandamide (NAE 20:4) ne s'accumule pas car elle est rapidement hydrolysée en acide gras libre et en éthanolamine par une activité essentiellement associée aux membranes.

L'appellation Fatty Acid Amide Hydrolase a été proposée par Cravatt *et al.* en 1996 suite au clonage du premier gène codant pour une protéine qui catalyse l'hydrolyse de plusieurs NAE dont l'OEA et l'anandamide. Une deuxième FAAH (FAAH-2) a été caractérisée en 2006. Cette enzyme a une spécificité moindre pour l'anandamide et les NAE poly-insaturées que la première FAAH-1 (Wei *et al.*, 2006).

A partir de la séquence de FAAH-1, d'autres séquences orthologues ont été identifiées dans différents organismes comme l'homme, la souris et les plantes (Giang *et al.*, 1997 ; Shrestha *et al.*, 2003). Les séquences protéiques de ces différentes FAAH ont permis d'identifier des séquences consensus spécifiques des amidohydrolases (Goparaju *et al.*, 1999 ; Chapman *et al.*, 2004). L'activité catalytique de ces enzymes pourrait être associée à la triade d'acides aminés catalytiques : Ser-Ser-Lys (Cravatt *et al.*, 2002).

3.4.2 Dégradation des NAE chez les plantes

Deux voies enzymatiques catabolisant les NAE ont été mises en évidence chez les plantes. La première est très semblable à celle observée chez les animaux puisqu'elle fait intervenir une hydrolase au fonctionnement analogue à l'hydrolase étudiée chez le rat. La seconde voie permet la modification des NAE polyinsaturées comme le NAE-18:3 en NAE-oxylipide *via* une activité lipoxygénase.

3.4.2.1 Identification de la première FAAH d'*Arabidopsis thaliana*

A partir de la signature protéique de la séquence de la première FAAH (FAAH-1) caractérisée chez l'animal, plusieurs gènes candidats codant pour des FAAH putatives ont été proposés chez *A. thaliana*. L'expression hétérologue d'un de ces gènes (At5g64440) chez *E.coli* a montré une activité d'hydrolyse d'une grande variété de NAE (12:0 ; 14:0 ; 16:0 ; 18:2) associée à la membrane plasmique (Shrestha *et al.*, 2003). Bien que l'anandamide ne soit pas un composé présent chez les plantes, cette FAAH peut aussi hydrolyser cette NAE animale (Shrestha *et al.*, 2003).

Le gène de cette protéine est exprimé dans les graines d'*A. thaliana* mais aussi dans différents organes et tissus comme dans les racines les feuilles et les fleurs (Chapman, 2004 ; Kilaru *et al.*, 2007). Des graines d'*A. thaliana* KO pour ce gène (mutant ADN-T) contiennent environ 30% de plus de NAE que les graines des plantes sauvages. *A contrario*, une diminution de 20 à 50% de ces lipides est observée chez les graines de plantes surexprimant cette enzyme (Wang *et al.*, 2006). Aucune séquence homologue au gène de la FAAH-2 n'a été identifiée chez *A. thaliana*.

3.4.2.2 Dégradation des NAE par la voie des lipoxygénases chez *A. thaliana*

Différentes NAE sont composées de chaînes d'acides gras avec une ou plusieurs insaturations comme les NAE18:2 ou NAE 18:3. Ces lipides peuvent être métabolisés non seulement par les FAAH comme nous venons de le voir mais aussi par un autre groupe d'enzymes : les lipoxygénases. Les LOX catalysent l'oxydation d'acides gras libres polyinsaturés comme l'acide linoléique et interviennent notamment dans la synthèse d'acide jasmonique ou encore de traumatin qui sont deux phyto-oxylipides impliqués dans les voies de défense des plantes face aux attaques pathogènes (Creelman et Mullet, 1997, Van Der Stelt. M *et al.*, 2000 ; La Camera *et al.*, 2004 ; Akram *et al.*, 2008). Ces enzymes, comme la 13-lipoxygénase (13-LOX), peuvent également oxyder les NAE en hydroperoxyde-NAE (Van der Stelt *et al.*, 1997 ; 2000). Les composés NAE-18:2 et NAE-18:3 hydroperoxydes peuvent ensuite être métabolisés par des hydroperoxidases (HPO) et par des allene oxyde synthases (AOS) en de nouveaux oxylipides (Shrestha *et al.*, 2002) (figure II-26). Les études *in vivo* menées par Shrestha *et al.* (2002) sur des graines de *Gossypium hirsutum* après imbibition ont montré pour la première fois la présence d'acide 12-oxo-13-hydroxy-(9z)-octadécanoïque chez les plantes. Cette synthèse indique que le NAE 18:2 dans les graines est pour une partie métabolisée par une 13-LOX et une 13-AOS.

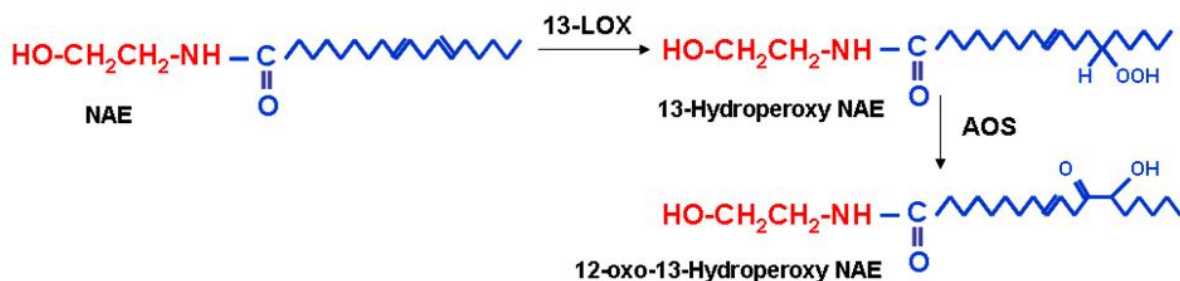


Figure II-26. Voie lipoxygénase des NAE chez le coton.

AOS, allène oxyde synthase ; 13-LOX, 13-lipoxygénase ; NAE, N-acyléthanolamine.

L'activité des lipoxygénases est localisée au niveau du cytosol des cellules, mais tout comme l'activité FAAH elle est aussi présente au niveau des membranes plasmiques (Shrestha *et al.*, 2002).

Les effets de ces NAE-oxylipides ne sont pas encore très clairs. Ces lipides étant rapidement métabolisés dans les graines, il a été proposé qu'ils puissent jouer un rôle de médiateur dans la germination (Shrestha *et al.*, 2002).

En résumé, le métabolisme des NAE chez les plantes est assez similaire à celui observé chez les animaux. La synthèse de NAE est principalement catalysée par une NAPE-

PLD pour les animaux ou par plusieurs isoformes de PLD chez les plantes. Puis ces NAE sont dégradées par des amides hydrolases (FAAH) en acide gras libre et éthanolamine. Les FAAH végétales et animales présentent de fortes homologues de structure au niveau de leurs sites catalytiques et de leurs topologies générales (Chapman, 2004). Plusieurs FAAH peuvent intervenir dans la dégradation de ces NAE chez les animaux alors que pour le moment, une seule FAAH a été caractérisée chez les plantes. Cependant une autre activité de la dégradation des NAE, *via* des lipoxygénases, a été mesurée chez les plantes. Ces lipoxygénases convertissent ces NAE en une nouvelle catégorie d'oxylipides : les NAE-oxylipides, dont les fonctions *in planta* restent obscures. L'ensemble de la voie métabolique des NAPE/NAE chez les animaux et chez les végétaux ainsi que les fonctions associées à ces lipides sont résumés dans la figure II-27.

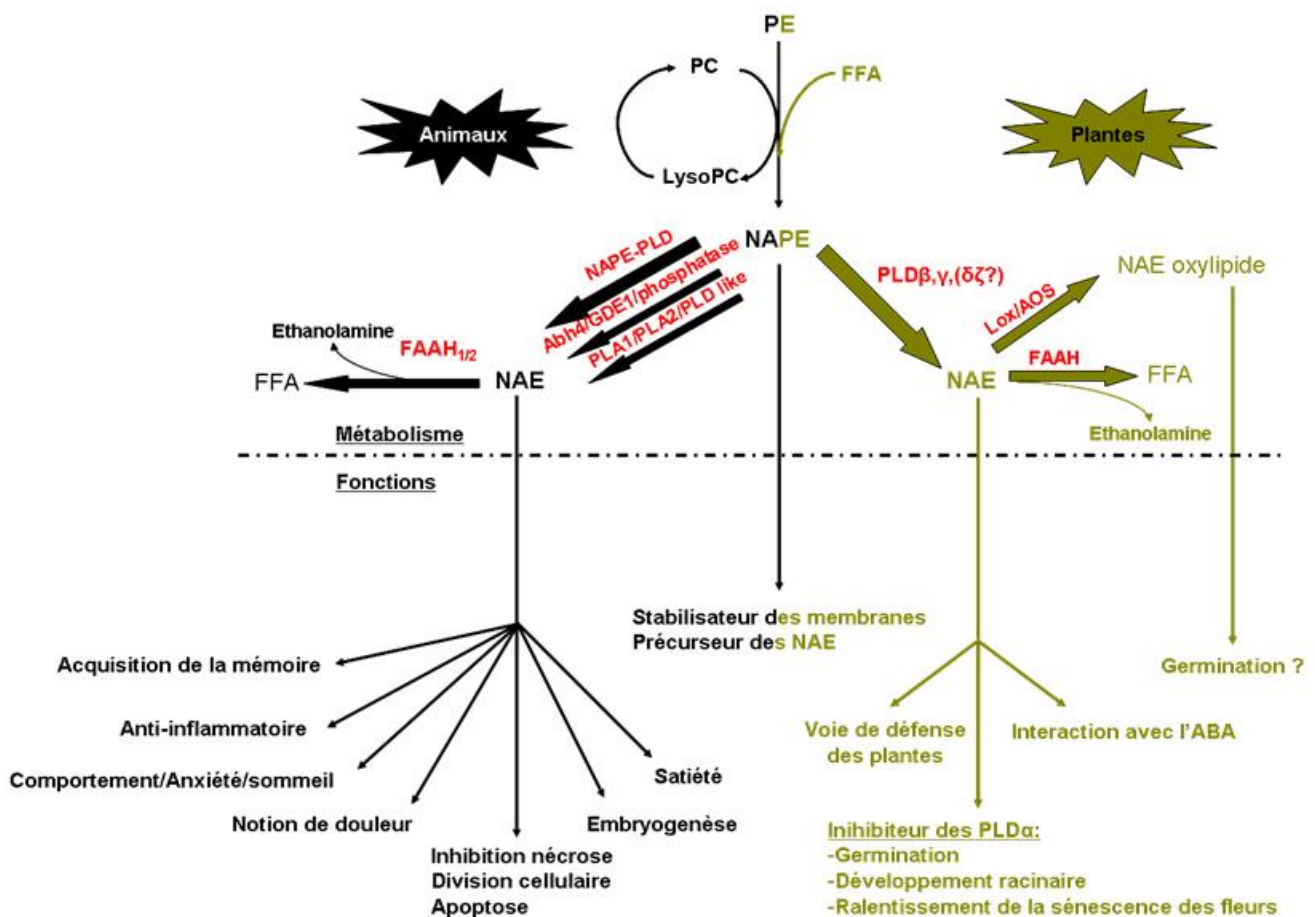


Figure II-27. Bilan des voies métaboliques et des fonctions des NAPE/NAE chez les animaux et chez les plantes. ABA, acide abscissique ; Abh4, α/β -hydrolase 4 ; FAAH_{1/2}, fatty acid amide hydrolase_{1/2} ; FFA, Free fatty acid (acide gras libre) ; GDE1, Glycérophosphodiesterase ; Lox, Lipoxygenase ; LysoPC, Lysophosphatidylcholine ; NAE, N-acyléthanolamine ; NAPE, N-acylphosphatidyléthanolamine ; NAPE-PLD, NAPE-phospholipase D ; PC, Phosphatidylcholine ; PE, Phosphatidyléthanolamine ; PLA_{1/2}, Phospholipase A_{1/2} ; PLD α , Phospholipase D α .

4 Les acyltransférases

Comme nous l'avons vu, la synthèse de NAPE chez les animaux comme chez les végétaux résulte d'un transfert d'un groupement acyle sur la fonction amine d'une PE. La réaction de synthèse de NAPE est donc catalysée par une acyltransférase.

4.1 Généralités

Les acyltransférases sont par définition des enzymes qui catalysent le transfert d'un groupement acyle sur un accepteur dont la nature peut varier : protéines, lipides. Il existe un grand nombre d'accepteurs lipidiques comme les stérols (Zweyick *et al.*, 2000), les ancras GPI (Glycosyl Phosphatidylinositol) (Bosson *et al.*, 2006), les glycérophosphocholines (Stalberg *et al.*, 2008), les diacylglycérols (Sorger et Daum, 2002), les glycérol-3-phosphates (Zheng et Zou, 2001), des lysolipides comme les lyso-PC (Testet *et al.*, 2005) ou encore les lyso-PA (Brown *et al.*, 1995). Certains phospholipides comme les PE et les PG sont acylés respectivement en N-acylphosphatidyléthanolmine (NAPE) et N-acylphosphatidylglycérol (NAPG) (Chapman et Moore, 1993a ; Merkel *et al.*, 2005).

La nature du donneur d'acyle varie aussi en fonction des enzymes. Il peut s'agir d'un acyl-CoA comme c'est le cas pour les glycérophosphate et les lysophosphatidique acide acyltransférases (G3P-AT, LPA-AT) impliquées dans la synthèse *de novo* des phospholipides. Il peut aussi s'agir d'un acyl-ACP comme par exemple pour la synthèse PA dans les chloroplastes des plantes et dans les bactéries. Un phospholipide peut être aussi donneur d'acyle comme dans le cas de l'activité de certaines DAG-AT (Diacylglycérol-acyltransférase) catalysant la synthèse des TAG (triacylglycérol) chez les plantes et les levures (Dahlqvist *et al.*, 2000).

4.2 Caractéristiques des séquences protéiques des acyltransférases impliquées dans le métabolisme lipidique

On peut diviser les acyltransférases en deux grands groupes en fonction de leurs séquences en acides aminés : les acyltransférases dites à domaine « plsC » et les acyltransférases « MBOAT » (Membrane-Bound O-AcylTransférase).

4.2.1 Les acyltransférases à domaine « plsc »

Les acyltransférases à domaine « plsc » tirent leur nom de leur similitude avec la LPA-AT d'*E.coli* dénommée ainsi. Ce groupe comprend des LPA-AT, des G3P-AT, des dihydroacetone phosphate acyltransférase (DHAP-AT), des lysophosphatidyléthanolamine acyltransférase (LPE-AT) impliquées dans la voie *de novo* ou dans le remodelage des phospholipides. Les séquences protéiques de ces différentes acyltransférases possèdent 4 régions fortement homologues dont les séquences consensus sont les suivantes : bloc I : [NX]-H-[RQ]-S-X-[LYIM]-D ; bloc II : G-X-[IF]-F-I-[RD]-R ; bloc III : F-[PLI]-E-G-[TG]-R[SX]-[RX] et bloc IV : [VI]-[PX]-[IVL]-[IV]-P-[VI]. Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier l'importance des résidus histidine (H) et asparagine (D) du bloc I, glycine (G) du bloc III et proline (P) du bloc IV pour l'activité catalytique des enzymes. De même, la phénylalanine (F) et l'arginine (R) du bloc II, le glutamate (E) et la sérine (S) du bloc III semblent impliquées dans la fixation du substrat à l'enzyme (Lewin *et al.*, 1999).

4.2.2 Les acyltransférases « MBOAT »

Un autre groupe d'acyltransférases impliquées dans le métabolisme lipidique a été identifié par Hofmann en 2000. Ces acyltransférases ne possèdent pas les séquences consensus caractéristiques des acyltransférases à domaine « plsc » mais un autre motif dit « MBOAT ». Ces protéines possèdent un résidu histidine très conservé à l'intérieur d'une importante région hydrophobe, probablement essentielle à leur activité. Appartiennent à cette famille, des lysolipides acyl-transférases, des cholestérol acyltransférases (Matsumoto *et al.*, 2008), des diacylglycérol acyltransférases et des synthases de cires transférant une chaîne acyle sur des alcools à longues chaînes (Yu *et al.*, 1996 ; Matsumoto *et al.*, 2008).

4.3 Rôles des acyltransférases dans le métabolisme lipidique

4.3.1 Synthèse de *de novo* des phospholipides via les acyltransférases

La plupart des phospholipides (PC, PI, PS et PE) sont synthétisés par la voie de synthèse *de novo* à partir d'un même précurseur : le PA. Ce lipide peut être obtenu selon deux voies de synthèse : la voie du glycérol-3-phosphate (G3P) et la voie du dihydroxyacétone phosphate (DHAP).

La synthèse de PA a lieu dans différents compartiments (plaste, RE). Dans chaque compartiment, une glycérol-3-phosphate acyltransférase catalyse la première des réactions nécessaires à la synthèse du PA (et donc pour la majorité des autres phospholipides) en

transférant un groupement acyle en position *sn1* du squelette glycérol-phosphate, formant ainsi du lyso-PA. Puis une deuxième acyltransférase, la LPA-AT, catalyse la réaction d'acylation en position *sn2* du résidu lyso pour former du PA.

Les acyltransférases impliquées dans la synthèse du PA sont toutes codées par le génome nucléaire mais diffèrent par leur spécificité envers le substrat acyle (pour revue Frentzen *et al.*, 1983). Ces acyltransférases jouent ainsi un rôle important dans l'établissement du profil lipidique des différentes membranes cellulaires.

Un grand nombre d'acyltransférases impliquées dans la voie de synthèse *de novo* des lipides ont été caractérisées et cela dans de nombreux organismes. Pour n'en citer que quelques unes, la première glycérol-3-phosphate acyltransférase a été caractérisée chez *E. coli* (PlsB pour PhosphoLipid Synthesis B) par l'équipe de Bell (Cronan et Bell, 1974), la première G3P-AT de *Saccharomyces cerevisiae* (Gat1p) a été identifiée par Tillman et Bell en 1986, et chez *Arabidopsis thaliana*, AtS1p a été le premier gène de G3P-AT identifié (Nishida *et al.*, 1993).

4.3.2 Remodelage des lipides via les acyltransférases

La deuxième fonction de ces acyltransférases correspond au remodelage des lipides. Le remodelage consiste à modifier après leur synthèse la nature des chaînes acyles présentes en position *sn1* et/ou *sn2* des phospholipides. La protéine YPR140wp a été identifiée comme étant non seulement une lysophosphatidylcholine-acyltransférase (LPC-AT) chez *S. cerevisiae*, mais aussi comme une acyltransférase impliquée dans le remodelage des CL (Testet *et al.*, 2005).

4.3.3 Rôles des acyltransférases dans le transfert des phospholipides entre organites

La PC est un phospholipide présent au niveau des membranes des chloroplastes alors que cet organite est incapable de synthétiser ce phospholipide à partir de DAG et de CDP-choline car il ne possède pas d'activité CDP-choline phosphotransférase (Douce et Joyard, 1978). Un transport de PC du RE vers les chloroplastes est donc nécessaire. Cependant, du fait de son caractère hydrophobe, la PC ne peut pas diffuser dans le cytosol. Différentes études réalisées *in vitro* (Bessoule *et al.*, 1995 ; Testet *et al.*, 1999) et *in vivo* (Mongrand *et al.*, 1997, 2000) ont été menées au laboratoire et tous les résultats obtenus peuvent s'interpréter par l'existence d'un intermédiaire lyso-PC dans les échanges lipidiques entre RE et plastides. Ce lysolipide est ensuite acylé en lipide membranaire (PC) par action d'une acyltransférase plastidiale (figure II-28).

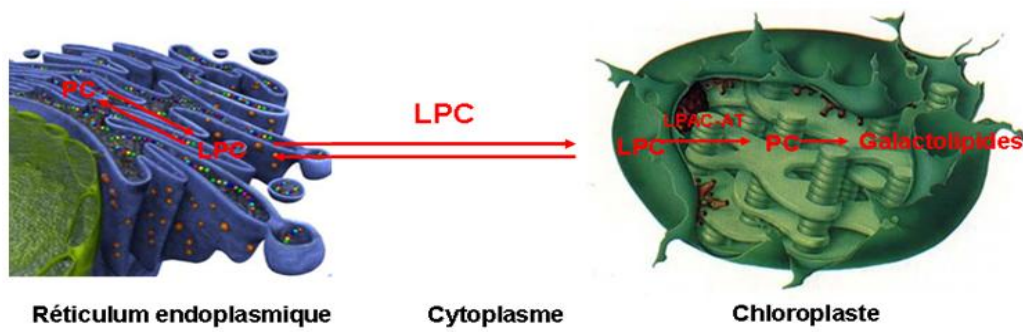


Figure II-28. Transfert de PC par partage de lysoPC entre le RE et les chloroplastes, et acylation de ces molécules par des acyltransférases du compartiment « cible » (chloroplastes).

LPC, Lyso-phosphatidylcholine, LPC-AT, Lysophosphatidylcholine-acyltransférase ; PC, phosphatidylcholine.

De la même façon, les mitochondries de plantes et de levure ne possèdent pas certaines des enzymes nécessaires à la synthèse de *novo* du PA et de la PC, l'hypothèse d'un intermédiaire « lysolipide » a donc été avancée pour expliquer la présence de ces deux phospholipides dans les mitochondries de plantes et de levure (Testet *et al.*, 1996, 2005).

Selon ces modèles les lysolipides acyltransférases seraient donc également des protéines impliquées dans l'import de lipides dans divers compartiments cellulaires.

PARTIE III

MATERIELS ET METHODES

Matériels et Méthodes

1. Etude Bioinformatique

1.1 Alignements multiples de séquences

La recherche de gènes d'*Arabidopsis thaliana* susceptibles de coder pour des acyltransférases a été réalisée « *in silico* » dans la base de données TAIR (The *Arabidopsis* Information Ressource, <http://www.arabidopsis.org/>). Ce programme a permis d'identifier des séquences protéiques présentes dans SwissProt (<http://www.expasy.org/sprot/>) homologues à la lysophosphatidylcholine acyltransférase de levure, YPR140wp. Le programme BLASTp utilise l'algorithme heuristique BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) qui a pour fonction de rechercher des séquences similaires. Il identifie dans une ou plusieurs bases de données le meilleur alignement avec la séquence protéique fournie. Ce programme utilise des matrices de substitutions.

Les séquences protéiques obtenues ont été alignées à l'aide du logiciel ClustalW (Thompson *et al.*, 1994 ; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) (Corpet, 1988 ; <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin.html>). Ce programme d'alignements multiples de séquences utilise un algorithme progressif basé sur la similarité des paires de séquences. Les deux séquences les plus similaires servent de base pour l'élaboration d'un alignement multiple. Les séquences additionnelles sont ensuite alignées avec l'alignement multiple primaire.

1.2 Edition et mise en forme des alignements multiples

Les séquences alignées ont ensuite été mises en forme manuellement grâce au logiciel Genedoc (Nicholas *et al.*, 1997, <http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). Il s'agit d'un programme d'édition, d'analyse et de présentation d'alignements multiples de séquences pour Windows. Ce programme permet notamment de voir les acides aminés les plus conservés dans les séquences protéiques étudiées. Il a donc surtout été utilisé pour mettre en évidence les domaines conservés des séquences protéiques.

1.3 Prédiction des domaines transmembranaires et leur topologie

La protéine At1g78690p a été recherchée dans la base de données Aramemnon (Schwacke *et al.*, 2003) qui répertorie toutes les protéines membranaires putatives d'*A. thaliana*. Cette base de données fournit également des informations sur la structure et la localisation de ces protéines.

Les séquences protéiques ont été également analysées avec les logiciels suivants :

- ProtScale, qui est un outil de prédictions de propriétés physico-chimiques (Gasteiger *et al.*, 2003) ;

- HMMTOP, qui prédit la présence d'hélices transmembranaires et la topologie des protéines en utilisant la méthode décrite par Tusnady et Simon (1998) ;

- TMHMM, qui est un programme de prédictions d'hélices transmembranaires (Sonnhammer *et al.*, 1998 ; Krogh *et al.*, 2001) ;

- TopPred2, programme de prédiction de segments transmembranaires basé sur l'algorithme de Von Heijne (Von Heijne, 1992 ; Claros et Von Heijne, 1994) ;

- TMPred, programme de prédictions d'hélices transmembranaires dont l'algorithme est basé sur l'analyse statistique d'une base de données de protéines transmembranaires TMbase (Hofmann et Stoffel, 1993) ;

Le profil d'hydrophobicité a été déterminé à l'aide du logiciel ProtScale (Gasteiger *et al.*, 2003) en utilisant l'algorithme de Kyte et Doolittle (1982). Cet algorithme est basé sur l'analyse de l'hydrophobicité des différentes régions d'une protéine à partir de sa séquence primaire. Il utilise une table d'hydrophobicité construite à partir de l'analyse de protéines connues.

1.4 Recherche de signaux d'adressage et de la localisation intracellulaire

La séquence de la protéine d'intérêt a été soumise à plusieurs algorithmes pour prédire sa localisation intracellulaire et rechercher des sites de modifications post-traductionnelles potentielles. Les algorithmes utilisés sont :

- ChloroP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) qui permet de prédire un adressage chloroplastique (Emanuelsson *et al.*, 1999) ;

- DGPI (http://129.194.185.165/DGPI_en_demo_en.html) qui permet de prédire les sites potentiels d'ancrage d'une protéine par un glycosyl phosphatidylinositol (GPI) ;

- iPSORT (<http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp.iPSORT/>) qui prédit la présence de signaux d'adressage N-terminaux (Bannai *et al.*, 2002) ;

-Myristoylator (<http://au.expasy.org/tools/myristoylator/>) qui prédit la présence de sites de myristoylation (Bologna *et al.*, 2004) ;

-Prenylation Prediction Suite, (<http://mendel.imp.univie.ac.at/sat/PrePS/>) qui prédit la présence de sites de prénylation (Maurer-Stroch et Eisenhaber, 2005)

-PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>) et TargertP ([http:// www.cbs.dtu.dk / services / TargetP](http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP)) qui permettent de prédire la localisation subcellulaire d'une protéine (Emanuelsson *et al.*, 2000).

2. Matériels Biologiques

2.1 Matériel végétal et conditions de culture

2.1.1 *Arabidopsis thaliana* ou "l'arabette des dames"

L'arabette des dames ou *Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia-0 (Col0) a été utilisée durant cette étude. Cette plante modèle est un membre de la famille des Brassicacées qui inclut diverses espèces cultivées telles que le chou, le navet, le radis, la moutarde, etc. C'est une plante herbacée de 10 à 15 cm de haut à l'état adulte (Figure III-1). Elle est formée d'une rosette (d'une dizaine de feuilles de 2 à 7 cm de diamètre) située au raz du sol, d'une courte racine et d'un pédoncule floral portant une inflorescence. D'autres inflorescences se forment sur les rameaux secondaires. Les fleurs blanches, de quelques millimètres, portent quatre sépales et quatre pétales disposés en croix, six étamines (4 longues et 2 courtes) et un pistil. Elle se reproduit par autofécondation et chaque fleur se transforme en un fruit, la silique, contenant de 30 à 50 graines. Chaque plante peut ainsi produire plusieurs milliers de graines à chaque génération. Cette plante offre des avantages importants pour la recherche en génétique et en biologie moléculaire :

- un petit génome (125 Mb) entièrement séquencé ;
- 5 chromosomes génétiquement et physiquement cartographiés ;
- un cycle de vie rapide (environ 6 à 8 semaines de graine à graine) ;
- une production de graines importante ;
- une culture facile dans un espace restreint ;
- des méthodes de transformations efficaces *via Agrobacterium tumefaciens* ;
- un nombre important de lignées mutantes disponibles ;

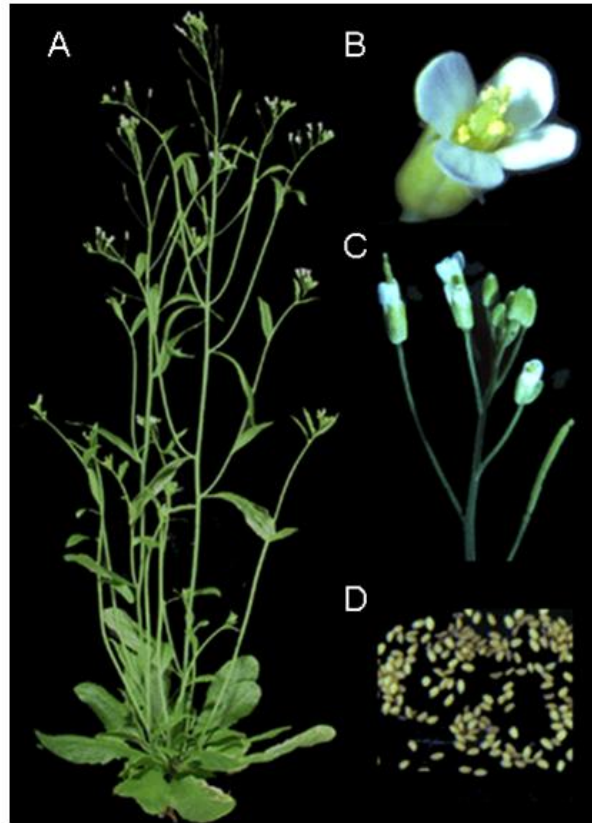


Figure III-1. *Arabidopsis thaliana*

A : plante adulte ; B : fleur ; C : hampe floral ; D: graines

2.1.2 Mutants d'*Arabidopsis thaliana* et plants de tabac

Une lignée d'*Arabidopsis thaliana* ADN-T générée par le Salk Institute, La Jolla, CA (Alonso *et al.*, 2003) a été utilisée durant cette étude. Cette lignée, Salk 029716, est une lignée de troisième génération issue de la transformation de plants d'*Arabidopsis thaliana*, écotype Col0, par *Agrobacterium tumefaciens* transformée par le vecteur pROK2.

De plus, différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana* transformées par la séquence 35S::At1g78690 (promoteur « 35S » du virus de la mosaïque du chou-fleur fusionné à l'ADNc du gène d'intérêt) ont été générées et utilisées pour cette étude ainsi que des lignées transformées par la séquence, PAt1g78690::GUS (promoteur du gène At1g78690 fusionné à la séquence codante de la β -glucuronidase) pour les expériences de localisation tissulaire de l'activité du promoteur du gène d'intérêt.

Pour les expériences d'expression transitoire de protéines fusionnées à l'EGFP (Enhanced green fluorescent protein) ou à l'EYFP (Enhanced yellow fluorescent protein), des plants de tabac (*Nicotiana tabacum* L.) de 3 à 4 semaines, cultivés à 22-24°C, ont été utilisés.

2.1.3 Stérilisation des graines

Les graines d'*Arabidopsis thaliana* ont été décontaminées en surface pendant 15 minutes en présence de 1ml de chlore actif 2,5% (v/v) et de Triton X-100 0,002% (v/v). Elles ont été ensuite rincées au minimum 5 fois avec 1ml d'eau stérile avant d'être semées.

2.1.4 Milieux et conditions de culture

Les graines stérilisées ont été semées dans des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé composé de 4,4g.l⁻¹ de milieu MS (Murashige et Skoog), 0,5g.l⁻¹ de 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES) et 7g.l⁻¹ d'agar à pH 5,8. Pour certaines expériences, 10g.l⁻¹ de saccharose ont été ajoutés au milieu. Une concentration de 35μg.ml⁻¹ de kanamycine est ajoutée au milieu de culture des plantes lors de la sélection de différentes lignées transgéniques. Les boîtes ont été ensuite placées à 4 °C pendant 48h afin de synchroniser la germination des graines et de lever leur dormance. La culture a été ensuite effectuée dans des enceintes phytotroniques à température, humidité et luminosité contrôlées : 22°C, 80% d'humidité et photopériode de 15h/9h (jour/nuit). Les plantes âgées d'environ 20 jours ont été transférées en terre (mélange de terreau, sable et vermiculite dans des proportions 3:1:1). Un dôme plastique a été alors placé quelques jours au dessus des pots, pour maintenir une forte humidité. Lorsque les siliques ont commencé à jaunir, les plantes ont été sorties des enceintes et laissées à température ambiante. Dès qu'elles sont complètement sèches, les graines ont été récoltées.

2.2 Souches bactériennes et milieux de culture

Différents souches d'E.coli ont été utilisées dans cette étude:

Les souches **XL1 blue MRF'** (Stratagène) de génotype $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}[F' \text{ proAB lac}^pZ\Delta M15Tn10(Ter')]$ et **DH5α** (Invitrogen) de génotype $F-\phi80lacZ \Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA sup E44 \lambda\text{-thi1 gyrA96 relA1}$ ont été utilisées comme souches intermédiaires pour les clonages et les amplifications de plasmides.

La souche **BL21(DE3)** (Novagen) de génotype : $F'ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) a été utilisée pour la sur-expression des protéines recombinantes fusionnées à un motif composé de 6 histidines. Cette souche bactérienne, lysogène pour le bactériophage

DE3 (dérivé de λ), porte une copie chromosomique du gène de l'ARN polymérase T7 sous le contrôle du promoteur lacUV5 qui est inductible à l'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG).

La souche **C41(DE3)** (Avidis) provenant de la souche BL21(DE3) a été utilisée pour des tests d'activités enzymatiques. Le génotype de cette souche est : F⁺ *ompT gal hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) dcm lon λ DE3 pLysS*. Les gènes *ompT* (Studier et Moffatt, 1986 ; Studier *et al.*, 1990) et *lon* (Phillips *et al.*, 1984) codent respectivement pour la protéase pariétale (responsable de la dégradation des protéines hétérologues) et la principale protéase cytoplasmique (responsable de la dégradation des protéines mal repliées ou instables). C41(DE3) provenant de la souche BL21 est elle aussi porteuse d'une copie du promoteur reconnu par l'ARN polymérase T7. Cette souche peut accumuler davantage de protéines hétérologues dans les membranes que la souche BL21 et ce, sans effet toxique sur son développement (Miroux et Walker, 1996).

Différentes souches d'*Agrobacterium tumefaciens* ont été également utilisées pour la transformation de différentes plantes (*A. thaliana*, *N. tabacum*) :

La souche **C58C1** a été utilisée comme vecteur de transformation pour générer des plantes d'*Arabidopsis thaliana* transgéniques. Elle possède le plasmide pM90 qui contient les gènes de virulence *Vir* permettant l'insertion d'un ADN de transfert (ADN-T) dans le noyau des cellules végétales (Koncz *et al.*, 1992).

La souche **GV3101** (pM90) a été utilisée comme vecteur pour transformer des cellules d'épiderme de feuille de tabac. Comme la souche C58C1, elle possède le plasmide pM90.

Toutes les souches bactériennes ont été cultivées dans du milieu Luria-Bertani (LB (Sigma)) (Bactotryptone 1% (p/v), extrait de levure 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v)) en présence ou non d'antibiotiques (tableau III-1) à une température appropriée (37°C pour *E. coli* et 30°C pour *A. tumefaciens*) et sous agitation (220 rpm). Pour les milieux solides, 1,5% (p/v) d'agar bactériologique ont été ajoutés. Les milieux sans antibiotique ont été stérilisés à 120°C pendant 20 minutes. Les antibiotiques ont été stérilisés par filtration (0,20 μ m) et ajoutés au milieu adéquat à une température inférieure à 55°C.

Antibiotique	Concentration utilisée pour la culture d' <i>E. coli</i>	Concentration utilisée pour la culture d' <i>A. tumefaciens</i>
Ampicilline	100 µg/ml	-
Spectinomycine	50 µg/ml	100 µg/ml
Kanamycine	25 µg/ml	25 µg/ml
Gentamycine	10 µg/ml	10 µg/ml

Tableau III-1 : Concentrations d'antibiotiques utilisées.

2.3 Plasmides et vecteurs d'expression

Différents vecteurs ont été utilisés dans cette étude :

- Le vecteur **pGEM®-TEasy** (Promega), représenté dans la figure III-2, a été utilisé comme vecteur intermédiaire pour le clonage de fragments d'ADN amplifiés par PCR à l'aide de la Phusion™ High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes). Ce plasmide de 3015pb contient les promoteurs T7 et SP6 ARN polymérase situés à chaque extrémité du site multiple de clonage. Il contient aussi une origine de réplication du phage filamenteux f1, un gène de résistance à l'ampicilline et une région du gène lacZ codant pour la β-galactosidase. L'insertion d'un fragment d'ADN dans la région du gène lacZ permet d'identifier facilement les clones positifs par criblage coloré (blanc/bleu) sur milieu solide. Le plasmide est vendu sous forme linéaire avec une déoxythymidine non appariée en 3'. La présence de cette base permet la ligation de produits d'amplification PCR (polymerase chain reaction) possédant une seule déoxyadénine non appariée en 3' du fragment amplifié.

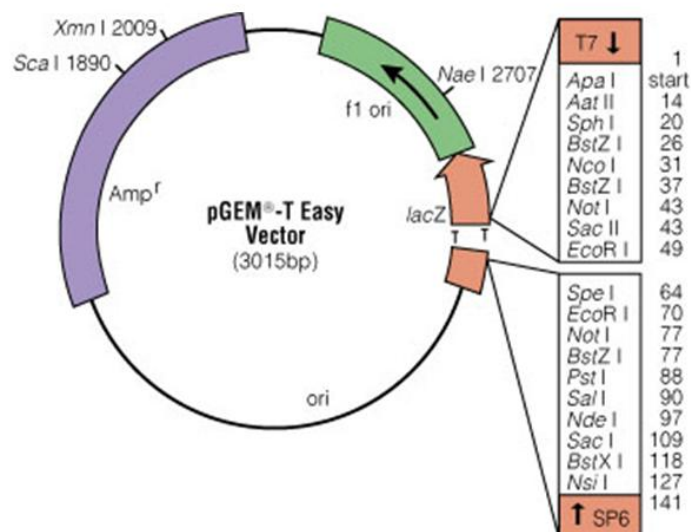


Figure III-2. Carte du plasmide pGEM-T Easy (Promega) utilisé pour le clonage classique.

- Le vecteur d'expression bactérien **pET-15b** (Novagen) représenté figure III-3 a été utilisé pour exprimer de façon hétérologue la protéine d'intérêt chez *E. coli* (C41(DE3)). Le gène d'intérêt cloné dans ce vecteur de 5708pb est sous le contrôle d'un promoteur fort inducible, reconnu par l'ARN polymérase du phage T7. Pour que la protéine soit produite, le plasmide recombinant doit être transféré dans une souche d'*E. coli* (telle que C41-(DE3)) contenant une copie chromosomique du gène codant pour la T7 ARN polymérase sous le contrôle du promoteur lacUV5. Ainsi, l'ajout dans le milieu de culture d'IPTG induit la production de la T7 ARN polymérase qui à son tour va permettre la transcription des gènes clonés dans le vecteur pET-15b de manière exclusive et à très haut niveau.

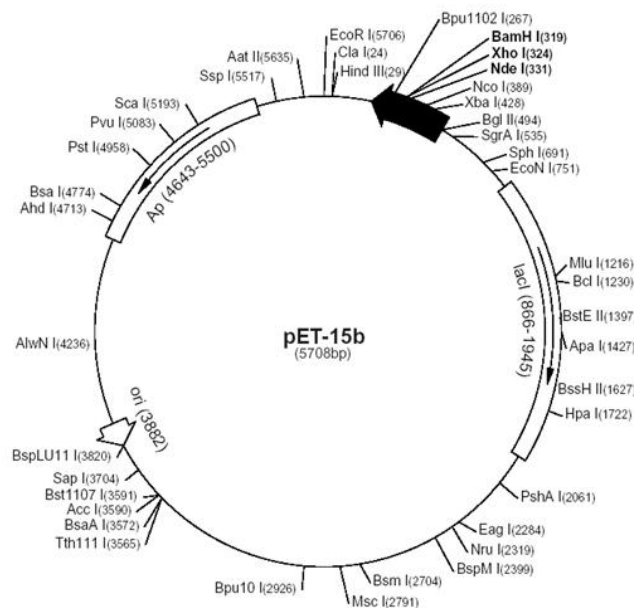


Figure III-3. Carte du plasmide pET-15b utilisé pour le clonage classique.

- Le plasmide **pDONR221** (Invitrogen) représenté figure III-4 est le vecteur d'entrée utilisé pour le clonage par la technologie GATEWAY™. Ce vecteur permet de générer, après recombinaison avec des produits PCR bordés par les séquences attB (site de recombinaison pour le bactériophage λ chez *E. coli*), des clones d'entrée contenant une séquence d'intérêt bordée par les séquences attL. Ce plasmide possède le gène de résistance à la kanamycine. Le site de clonage est situé dans le gène *ccdB* qui code pour une protéine toxique pour la plupart des bactéries (inhibiteur de l'ADN gyrase) qui empêche la croissance des bactéries transformées par le vecteur ne contenant pas la séquence d'intérêt.

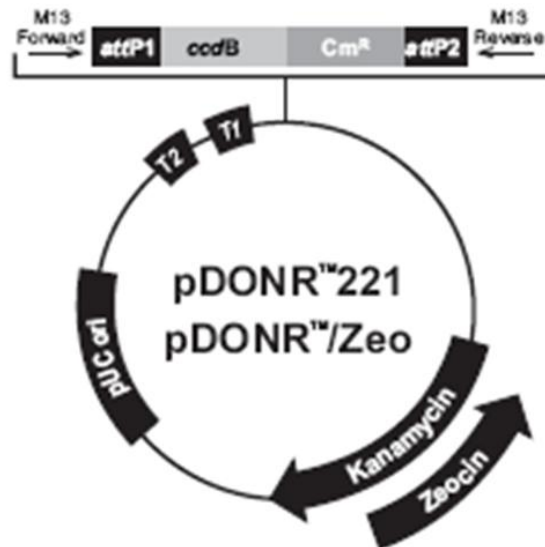


Figure III-4. Carte du plasmide pDONR™221 (Invitrogen), vecteur d'entrée utilisé pour le clonage par la technologie GATEWAY™.

- Le plasmide **pDEST17** (Invitrogen) représenté figure III-5 est un vecteur de destination compatible avec le système GATEWAY™. Ce plasmide permet la surexpression d'une protéine fusionnée à une étiquette de 6 histidines en position Nter de la protéine d'intérêt. L'ADNc de la séquence d'intérêt est sous le contrôle du promoteur T7 activé par l'ARN polymérase T7 d'*E.coli* après induction à l'IPTG. Le plasmide pDEST17 possède le gène de résistance l'ampicilline.

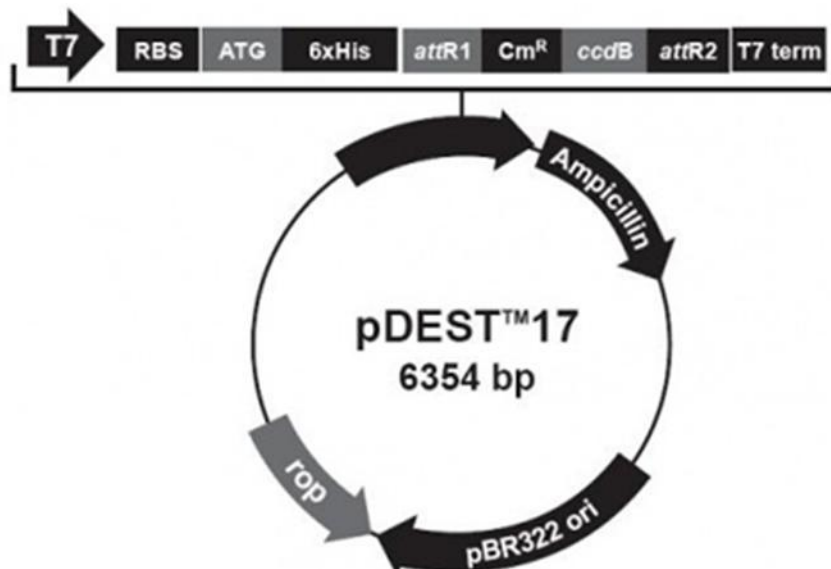


Figure III-5. Carte du plasmide pDEST™17 (Invitrogen), vecteur de destination permettant la production d'une protéine avec une étiquette histidine à son extrémité N-terminal.

- Les vecteurs **pK7WG2D**, **pK7WGY2**, **pK7YWG2** et **pKGWFS7** (Karimi *et al.*, 2002) représentés respectivement dans les figures III-6, -7, -8 et -9, sont des vecteurs de destination compatibles avec le système GATEWAY™. Ils sont utilisés pour la transformation de plantes par *A. tumefaciens*. Issus du plasmide pZP200 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994), ils contiennent une origine de réplication pour *E. coli* et *A. tumefaciens* ainsi que le gène de résistance à la spectinomycine pour la sélection des clones transformés. Les séquences bordantes de l'ADN-T (LB et RB) sont dérivées du plasmide pTIT37. Le site de clonage est placé entre le promoteur et le terminateur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur pour la surexpression des séquences d'ADNc d'intérêt, excepté dans le vecteur pKGWFS7 où le promoteur 35S est absent.

Le vecteur pK7WG2D permet la production *in planta* d'une protéine d'intérêt sous le contrôle du promoteur constitutif 35S. Il contient le gène de résistance à la kanamycine permettant la sélection des plantes transformées (cf. paragraphe 2.1.4). Ce plasmide possède également le gène de l'EGFP libre qui permet de sélectionner les plantes par fluorescence des racines sous lumière UV.

Le vecteur pK7WGY2 permet la production *in planta* d'une protéine fusionnée à l'extrémité N-terminal de l'EYFP.

Le vecteur pK7YWG2 permet la production *in planta* d'une protéine fusionnée à l'extrémité C-terminal de l'EYFP.

Le vecteur pK7GWFS7 permet d'étudier l'activité du promoteur d'un gène d'intérêt. Il permet d'exprimer les gènes de l'EGFP et de la β -glucuronidase (GUS) d'*E. coli* sous le contrôle du promoteur étudié préalablement cloné dans le plasmide pDONR™221.

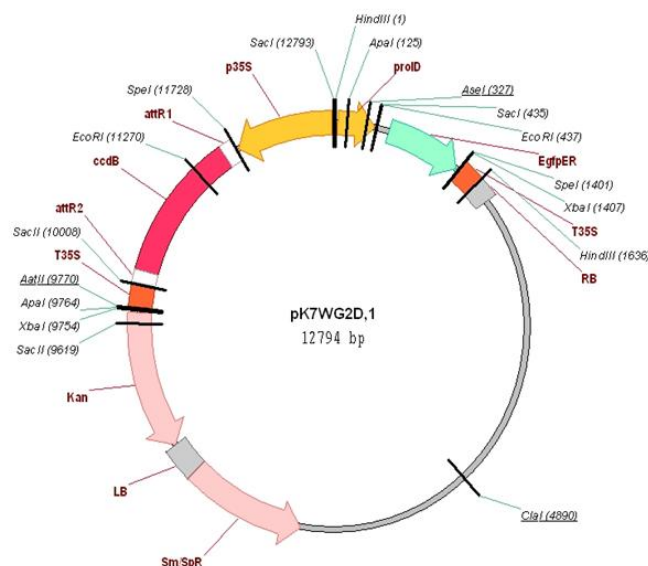


Figure III-6. Carte du plasmide pK7WG2D, vecteur de destination permettant la production constitutive *in planta* d'une protéine d'intérêt.

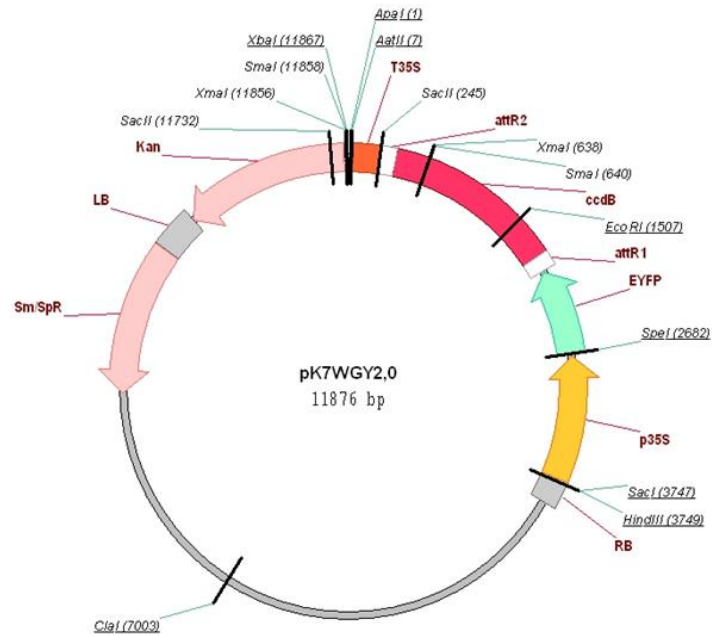


Figure III-7. Carte du plasmide pK7WGY2, vecteur de destination permettant la production *in planta* d'une protéine fusionnée à son extrémité N-terminal avec l'EYFP.

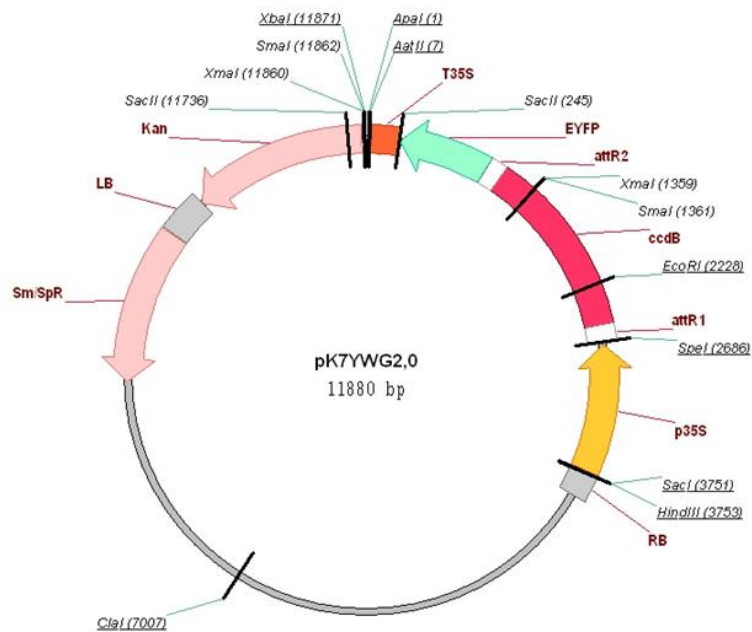


Figure III-8. Carte du plasmide pK7YWG2, vecteur de destination permettant la production *in planta* d'une protéine fusionnée à son extrémité C-terminal avec l'EYFP.

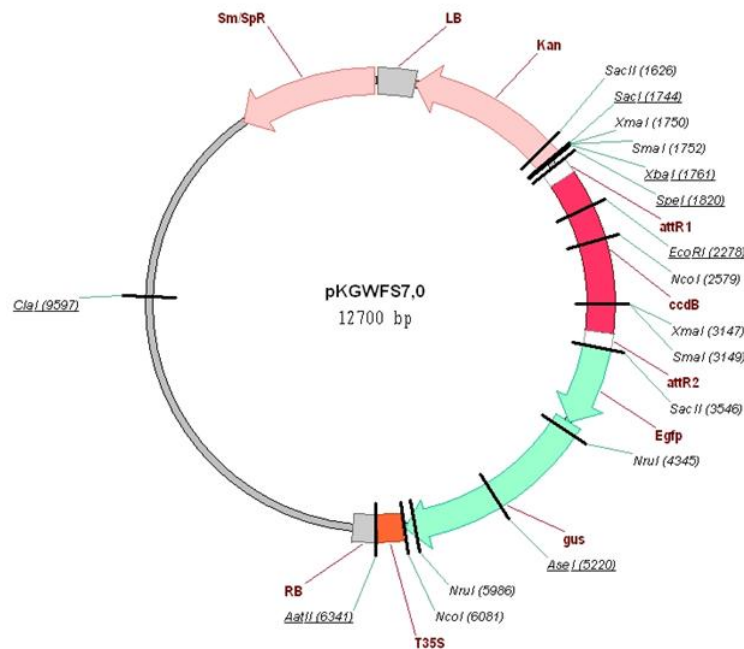


Figure III-9. Carte du plasmide pKGWFS7, vecteur de destination utilisé pour l'analyse *in planta* de l'activité du promoteur du gène d'intérêt.

3. Méthodes de biologie moléculaire

3.1 Extraction des acides nucléiques

3.1.1 Extraction des ARN totaux d'*Arabidopsis thaliana*

Les ARN totaux d'*Arabidopsis thaliana* ont été extraits à l'aide du kit « RNeasy Plant Mini Kit » (Qiagen), selon les instructions du fabricant, à partir de 200mg de feuilles d'*A. thaliana* broyées dans de l'azote liquide.

Afin d'éviter toute contamination par de l'ADN génomique lors de la PCR quantitative, les ARN totaux ont été traités à la DNase I en utilisant le kit DNA-free™ (AMBION) selon les recommandations du fabricant. La quantité et la qualité des ARN totaux extraits ont été déterminées par spectrophotométrie à 260 et 280nm à l'aide d'un NanoDrop (Thermo) et par électrophorèse sur gel d'agarose (cf. 3.1.5).

3.1.2 Extraction d'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana*

L'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana* a été extrait selon une méthode adaptée d'Edwards *et al.* (1991). Une feuille d'*Arabidopsis thaliana* a été prélevée et plongée dans de

l'azote liquide puis broyée pendant quelques secondes avec un micropilon dans un tube eppendorf de 1,5ml. A ce broyat, 200µl de tampon d'extraction (Tris-HCl à 0,2M pH 7,5 ; NaCl 0,25M ; EDTA 25mM ; SDS 0,5% (p/v)) ont été ajoutés. Après homogénéisation, l'échantillon a été centrifugé 5 minutes à 17000g à température ambiante, puis 170µl de surnageant ont été prélevés. Après ajout de 170µl d'isopropanol, l'échantillon a été vortexé, laissé 5 minutes à température ambiante puis centrifugé pendant 5 minutes à 17000g. Le surnageant a été éliminé et le culot a été séché à l'air puis repris dans 50µl d'eau stérile.

3.1.3 Extraction d'ADN plasmidique chez *E. coli* et *A. tumefaciens*

L'ADN plasmidique a été extrait à partir de 2 à 5ml de culture bactérienne en utilisant le kit « GenElute™ Plasmid Miniprep Kit » (Sigma) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN plasmidique a été élué dans 50µl d'eau stérile et dosé à l'aide d'un NanoDrop (Thermo).

3.1.4 Extraction des fragments d'ADN obtenus par PCR ou des produits de digestion

Pour être ligués dans les différents vecteurs ou pour être séquencés, les produits PCR ont été purifiés sur gel d'agarose (cf. 3.1.5). Après migration des produits digérés (vecteurs) ou des produits PCR par électrophorèse, les fragments d'intérêt du gel d'agarose contenant les acides nucléiques (visibles sous UV) ont été découpés à l'aide d'une lame de scalpel. La purification des fragments d'ADN contenus dans le gel d'agarose a ensuite été réalisée à l'aide du kit « Quiaquick purification kit » (Qiagen) selon le protocole indiqué par le fabricant.

Les fragments d'ADN ont été parfois directement purifiés à partir du mélange réactionnel obtenu en fin de PCR (s'il n'y a pas de contamination par d'autres fragments d'ADN). Ces purifications ont été réalisées à l'aide du même kit de purification « Quiaquick purification kit » (Qiagen) selon le protocole indiqué par le fabricant.

3.1.5 Electrophorèse des acides nucléiques

Les acides nucléiques ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel est composé en général de 1,1% (p/v) d'agarose dissous dans du tampon TAE 1X (40mM Tris ; 20mM acétate de sodium pH 8,3 ; 1mM EDTA) et aussi du bromure d'éthidium (BET) à 1% (v/v) afin de visualiser les acides nucléiques sous UV. Un µl de tampon de charge (0,05% bleu de bromophénol ; 10% glycérol) a été ajouté à 10µl d'échantillon et le mélange a été déposé dans un puits du gel d'agarose. Cinq µl de marqueur de taille ont été également

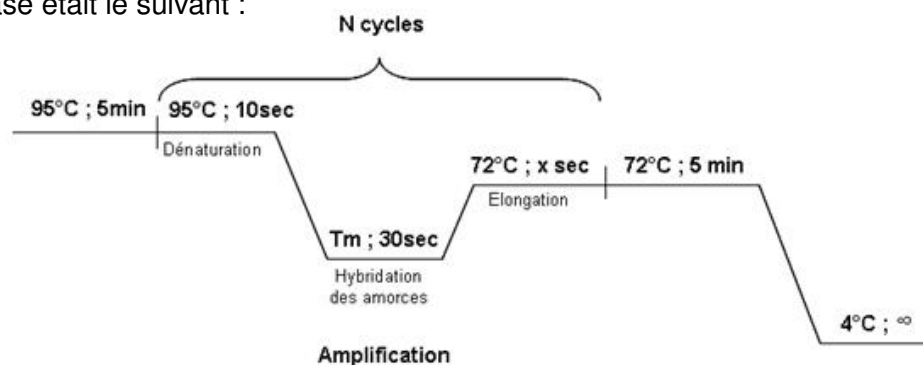
déposés. Pour les ARN, afin de vérifier la qualité de leur extraction, 4 µg d'ARN totaux ont été mélangés à 4 volumes de « bleu de bromophénol ». Les migrations ont été effectuées à 80V dans du tampon TAE 1X. Les images des gels ont été enregistrées et analysées (estimations des tailles et concentrations) à l'aide des appareils d'acquisition d'image Eagle Eyes (Stratagen) ou Image Quant 300 (Amersham) et de leur logiciel d'analyses.

3.2 Amplification *in vitro* de fragments d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR est une technique d'amplification d'une séquence d'ADN comportant 3 étapes : la dénaturation thermique de l'ADN bicaténaire matriciel, l'hybridation des amorces sur l'ADN matriciel et la synthèse, à partir des amorces, de l'ADN complémentaire grâce à une ADN polymérase thermostable. Les amplifications ont été réalisées dans un thermocycleur GeneAmp® PCR system 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems) ou iCycler (Biorad).

Pour amplifier des fragments dans le but de les cloner, la Phusion™ High-Fidelity DNA polymérase (Finnzymes) a été utilisée car elle réalise une synthèse de haute fidélité grâce à son activité exonucléase 3'→5' qui « corrige » les mésappariements. Pour les PCR de contrôles (pour confirmer la présence du gène dans différentes constructions), la Taq ADN polymérase qui est moins « fidèle » a été utilisée.

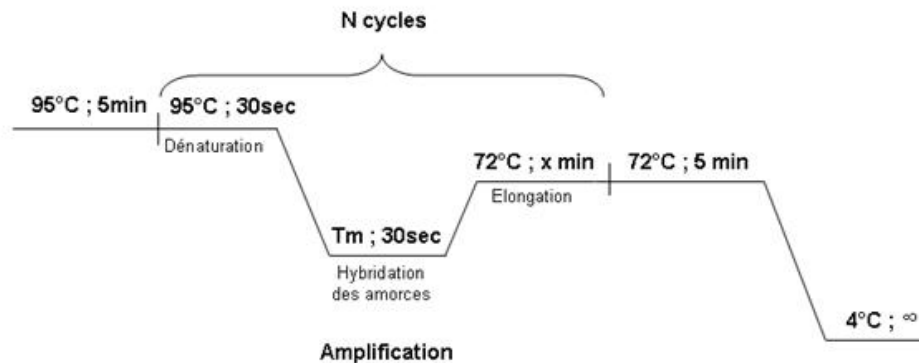
Les conditions d'amplification ont différé quelque peu selon la polymérase utilisée (Taq ADN polymérase purifiée au laboratoire à partir de la souche ampliTaq (fournie par l'UMR 619 - Biologie du fruit – INRA bordeaux) ou Phusion™ High-Fidelity DNA polymérase). Avec la Phusion™, les amplifications ont été réalisées dans un mélange de 50µl contenant : 1X de tampon Phusion HF (Tris-HCl 20mM ; pH 8,8 ; KCl 10mM ; (NH₄)₂SO₄ 10mM ; MgSO₄ 2mM ; 0,1mg/ml BSA, Triton X-100 0,1% (v/v)), 200µM de dNTPs, 0,5µM d'amorces, 0,02U/µl de Phusion DNA Polymerase. Le cycle de PCR utilisé avec cette polymérase était le suivant :



La T_m correspond à la température d'hybridation des amorces qui est spécifique pour chaque couple d'amorces. Le temps d'élongation (x sec) varie d'une PCR à l'autre. On considère que l'amplification par la Phusion est de 30sec.kb⁻¹. Enfin, « N » correspond au

nombre de cycles d'amplification répétés pour une PCR donnée (généralement de 25 à 35 cycles).

Avec la Taq polymérase purifiée au laboratoire, les réactions ont été réalisées dans un mélange de 25 μ l contenant : 1X de tampon Taq (Tris-HCl 20mM ; pH 8,8 ; (NH₄)SO₄ 10mM ; KCl 10mM ; MgSO₄ 2mM ; 0,1% Triton X-100 (v/v)), 200 μ M de dNTPs, 0,5 μ M d'amorces, 0,02U/ μ l de Taq Polymerase. On considère que l'amplification par la Taq classique est de 1min.Kb⁻¹. Le cycle de PCR utilisé avec cette Taq polymérase était le suivant :



3.3 RT-PCR quantitative

3.3.1 Principe

La technique de RT-PCR quantitative (RT, transcription inverse) permet la quantification du taux d'expression d'un gène cible par rapport à celui d'un ou plusieurs gènes de référence. Cette technique repose sur la détection de l'amplifiat néo-synthétisé après chaque cycle de PCR. Après une étape de transcription inverse, une séquence nucléotidique spécifique est amplifiée par PCR à l'aide d'un couple d'amorces encadrant la région cible. Au cours de cette PCR, un agent intercalant, le SYBR® green (présent dans le mélange réactionnel) est incorporé dans l'ADN et ce, proportionnellement à la quantité d'ADN présent. Lorsque le SYBR® green est lié à un ADN double brin, il émet de la fluorescence qui est directement mesurée dans le tube PCR à l'aide d'un fluorimètre couplé à un thermocycleur. Cette mesure permet la quantification en temps réel du produit d'amplification. Pour chaque réaction, un « cycle seuil » (Ct ou Threshold cycle) est déterminé. Il correspond au nombre de cycles de PCR pour lequel l'intensité de la fluorescence mesurée est significativement plus élevée que la fluorescence de base (figure III-10). Ce Ct est inversement proportionnel à la quantité d'ADN cible présent dans l'échantillon avant amplification.

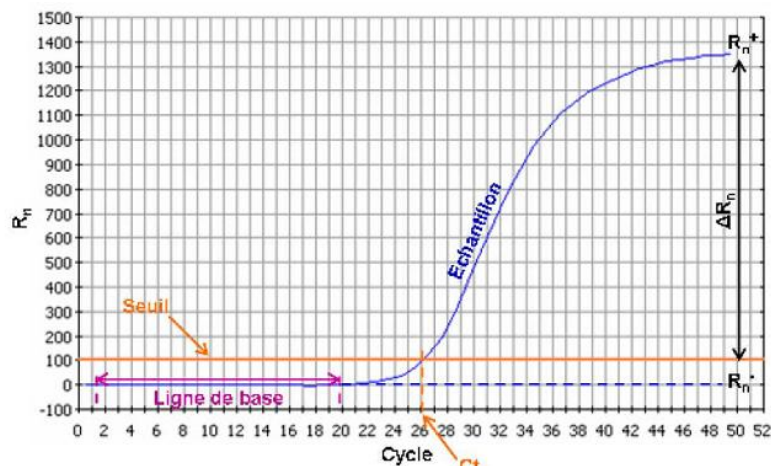


Figure III-10. Représentation d'un résultat de PCR quantitative.

Le « cycle seuil » ou C_t est déterminé durant la phase exponentielle à l'intersection de la ligne seuil (fixée à 100) avec la courbe de fluorescence de l'échantillon. R_n : Intensité de fluorescence.

3.3.2 Transcription inverse

Les ADNc ont été synthétisés à partir de $1\mu\text{g}$ d'ARN totaux extraits selon le protocole détaillé dans le paragraphe 3.1.1. Cette synthèse a été réalisée à l'aide du kit « SuperScriptTM II Reverse Transcriptase » (Invitrogen). Les ARN totaux ont été dénaturés 5 min à 65°C en présence de $1\mu\text{l}$ d'amorces d'oligo(dT) à $25\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ et de dNTP à $0,5\text{mM}$. Puis la transcription inverse des ARN totaux a été réalisée en présence de 8 unités d'enzyme inhibitrice des RNases et de 40 unités de reverse transcriptase pendant 50 minutes à 42°C . L'enzyme a été ensuite dénaturée 15 minutes à 70°C . Les ADNc ainsi synthétisés ont été utilisés pour les expériences de PCR quantitative.

Le mélange réactionnel obtenu après l'étape de transcription inverse a également été utilisé pour amplifier l'ADNc du gène At1g78690 par PCR classique pour la construction du plasmide pDONR221 et pET-15b avec cet ADNc (cf. paragraphes 3.4 et 3.5).

3.3.3 Sélection des amorces utilisées pour la PCR quantitative

Les séquences ayant servi de matrices à la sélection des amorces ont été obtenues grâce au programme CATMA. Ce programme permet d'obtenir des séquences spécifiques de 200 à 400 paires de bases pour un gène donné.

Les amorces ont été déterminées à l'aide du programme Primer 3 Input. Les paramètres sélectionnés pour définir les amorces ont été :

- longueur du produit d'amplification : de 100 à 150pb ;
- taille des amorces : minimum 18 bases et maximum 27 bases ;
- température d'hybridation : minimum 58°C et maximum 62°C ;
- pourcentage en guanine et cytosine : minimum 50% et maximum 80% ;

Les produits d'amplification proposés par Primer 3 Input ont été contrôlés à l'aide d'un programme d'anticipation de structures secondaires afin de vérifier l'absence de motifs susceptibles de se replier lors de la PCR quantitative. Les différentes amorces utilisées pour les expériences de PCR quantitative sont présentées dans le tableau III-2.

Nom	Séquence de l'amorce de 5'→3'	T _m (°C)
Amorce sens de la séquence d'intérêt	GGCCAAGTGCTAGACGAAAC	60
Amorce anti sens de la séquence d'intérêt	CAACCGCTTGGCTAAGAGTC	60
Eif4 sens	CTGATTTTGACCCGTCGTCT	60
Eif4 anti sens	AAGACAAACAACAAGCCGAAT	60
Actine sens	CCGAGCAGCATGAAGATTAAG	60
Actine anti sens	CATACTCTGCCTTAGAGATCCACA	60

Tableau III-2. Amorces utilisées lors des expériences de PCR-quantitative. Les amorces Eif4 et actine, sens et antisens, sont utilisées pour amplifier les ADNc de référence lors de la PCR quantitative pour normaliser les résultats obtenus afin d'estimer le taux d'expression du transcrit du gène d'intérêt.

3.3.4 Mélange réactionnel

Les réactions ont été effectuées dans un volume final de 25µl contenant 12,5 µl de mélange iQ SYBR green Supermix (Biorad) (KCl 100mM ; Tris-HCl 40mM ; pH 8,4 ; 0,4mM de chaque dNTP ; 50u/ml iTaq DNA polymerase ; MgCl₂ 6mM ; SYBR Green I 20nM fluorescéine), 0,25µM de chaque amorce et 2µl d'ADNc obtenus par transcription inverse (cf. 3.3.2) dilués au 10^{ème}.

3.3.5 Cycle de PCR

Les analyses ont été réalisées sur des triplicates. Le programme débute par une étape de 3 minutes à 95°C pour activer la TAQ polymérase, puis 40 cycles d'amplification de 30 secondes à 95°C et de 30 secondes à 58°C ont été réalisés. La fluorescence a été mesurée à la fin de chaque étape d'amplification. A la fin des cycles d'amplification, une courbe de fusion a été réalisée en augmentant la température du milieu réactionnel progressivement de 55°C à 95°C par palier de 0,5°C. A chaque palier, la fluorescence est mesurée afin de vérifier notamment la présence d'éventuelles contaminations (figure III-11).

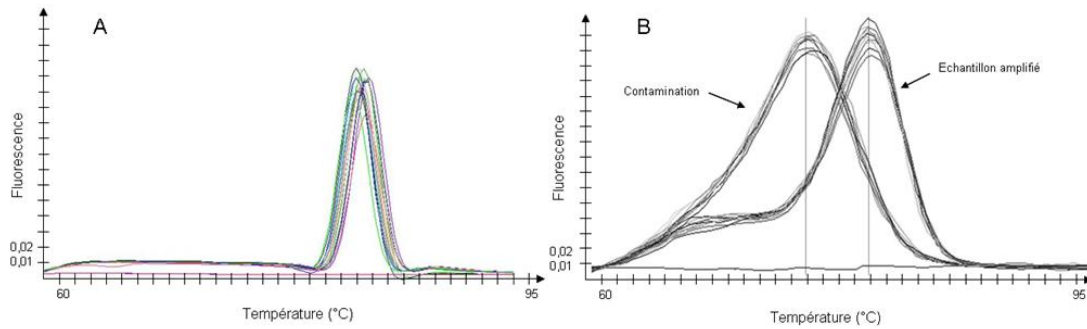


Figure III-11. Courbes de fusion. (A), courbes de fusion obtenues à partir d'un mélange PCR ne contenant qu'un seul ADNc amplifié ; (B), courbes de fusion obtenues à partir d'un mélange PCR contenant l'ADNc d'intérêt amplifié et un deuxième amplifié (contaminant).

3.3.6 Normalisation des résultats

Les résultats ont été traités et normalisés selon la méthode de « geNorm » (Manual version 1.4, du 10 novembre 2003). Les résultats bruts sont des moyennes de valeurs de Ct (sampleCt) et les déviations standards des Ct (SD sampleCt). Pour chaque échantillon (réalisé en triplicate), la quantité relative de transcrits de l'échantillon (Q) est déterminée par la formule suivante :

$$Q = (1 + E)^{(\min Ct - sampleCt)}$$

Où E est l'efficacité d'amplification (estimée à 100%, soit E=1) et « minCt » est la valeur de Ct la plus basse des 3 Ct obtenus pour un échantillon donné.

Ensuite la déviation standard de la quantité relative (SDQ) est calculée grâce à la formule :

$$SDQ = Q \times \ln(1 + E) \times SD_{sampleCt}$$

Les quantités relatives des échantillons sont ensuite normalisées (QNorm) à partir des quantités relatives des gènes constitutifs, Actine et Eif4, selon la formule :

$$Q_{Norm} = Q / (\text{Moyenne géométrique } (Q_{Actine} + Q_{Eif4}))$$

Les déviations standards de la quantité relative de transcrit sont normalisées à partir des déviations standards des deux gènes constitutifs selon la formule :

$$SDQ_{Norm} = Q_{Norm} \times ((SDQ/Q)^2 + (SDQ_{Actine}/(2 \times Q_{Actine}))^2 + (SDQ_{Eif4}/(2 \times Q_{Eif4}))^2)^{1/2}$$

Enfin, pour une meilleure lisibilité des résultats, l'abondance relative des transcrits des différents échantillons est rapportée à la valeur du témoin arbitrairement fixé à 1.

3.4 Clonage dans le vecteur pET-15b

Le vecteur pGEM®-T Easy a été utilisé comme vecteur intermédiaire pour faciliter le clonage des gènes dans le vecteur d'expression pET-15b (cf. 2.3).

3.4.1 Amplification du gène At1g78690

Le fragment d'ADN d'intérêt (environ 900pb) a été amplifié à partir des ADNc de plantes d'*A. thaliana* d'écotype Col0 par PCR (cf. paragraphes 3.2 et 3.3.2) avec la Phusion™ à l'aide des amorces permettant l'ajout de sites de restrictions Nco1 (**CCATGG**) et Xho1 (**CTCGAG**) nécessaires à son incorporation dans le vecteur pGEM®-T Easy et pET-15b (tableau III-3).

Nom	Séquence de l'amorce de 5'→3'	Tm (°C)
Amorce sens	GCC CCATGG CTATGGGGAAGATAATGGAATGGGCAGCAAGATC	63
Amorce anti sens	GCG CTCGAG TCATCACAACCGCTTGGCTAAGAGTCTCAATG	62

Tableau III-3. Amorces utilisées pour la réalisation des clonages classiques (pGEM®-T Easy/pET-15b).

3.4.2 Ligation de l'insert dans le plasmide pGEM®-T Easy

Le plasmide pGEM®-T Easy est commercialisé sous forme linéaire avec une déoxythymidine non appariée en 3'. La présence de cette base permet la ligation de produits d'amplification PCR possédant une seule déoxyadénine non appariée en 3' du fragment amplifié. La polymérase (Phusion™ High-Fidelity DNA polymérase) utilisée génère au cours de l'amplification des fragments à bouts francs. Cependant, il est possible de modifier (addition d'une déoxyadénosine en 3') les fragments amplifiés par cette polymérase en utilisant la procédure du A-tailing permettant ainsi de liguer les fragments obtenus dans le pGEM®-T-Easy.

L'ajout de la déoxyadénosine à l'extrémité 3' des fragments d'ADN a été réalisé à l'aide de la Taq polymérase du laboratoire. Ceci a été réalisé sur les fragments PCR purifiés dans un mélange réactionnel de 10µl contenant : 5µl de produit PCR purifié, 5U de Taq polymérase avec du MgCl₂, 1X de tampon d'amplification de la Taq polymérase, 200µM de dATP. Le mélange réactionnel a ensuite été incubé 30 minutes à 70°C.

La ligation dans pGEM®-T Easy est ensuite réalisée selon les recommandations du fabricant (Promega) dans un mélange réactionnel de 10µl contenant : 2µl d'insert, 1X de tampon de ligation, 50ng de vecteur pGEM®-T Easy, 3U/µL de T4 DNA ligase. Les

mélanges réactionnels ont ensuite été placés pendant 16 heures à 4°C puis utilisés tels quels pour transformer les bactéries par électroporation.

3.4.3 Transformation de bactéries *E. coli* par électroporation

Pour obtenir des bactéries *E. coli* électrocompétentes, une préculture a été réalisée dans 5ml de milieu LB pendant une nuit sous agitation (200 rpm). 500ml de milieu LB ont été ensuite ensemencés avec cette préculture et cultivés sous agitation jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 0,6. Toutes les étapes ultérieures ont été réalisées à 4°C. Il s'agit d'une série de cycles de centrifugation/re-suspension du culot bactérien dans une solution de glycérol 10% (v/v) avec des volumes de solutions décroissants : 300, 100, 50 et 2 ml. Les 2ml de bactéries ont été aliquotés et immédiatement congelés à -80°C.

La transformation des bactéries a été effectuée en utilisant l'appareillage Gene Pulser II System (Bio-Rad). Quarante μ l de bactéries électrocompétentes ont été décongelés dans la glace puis mélangés à une fraction de plasmide à transférer. Le mélange a été placé dans une cuve à électroporation (électrodes distantes de 0,2cm). Le générateur a été réglé pour délivrer un pulse de 1700V pendant quelques millisecondes (réglage à 25 μ F et 200ohms). Après l'impulsion électrique, les bactéries ont été immédiatement transférées dans 1 ml de milieu LB et ont été cultivées 1 heure à 37°C sous agitation.

3.4.4 Criblage des transformants

Le criblage des bactéries transformées a été réalisé sur boîte de Pétri contenant un milieu LB solidifié par de l'agar (Euromedex) à 1,5% (p/v) et contenant 100 μ g/ml d'ampicilline, 80 μ g/ml de X-5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal) et 1mM d'IPTG. Après une incubation d'une nuit à 37°C, les bactéries ayant incorporé le plasmide pGEM®-T Easy peuvent se développer grâce à la présence du gène de résistance à l'ampicilline porté par le plasmide. Par ailleurs ce plasmide possède une région du gène LacZ codant pour la β -galactosidase au niveau du site de clonage. Ainsi en présence du substrat chromogène X-Gal et d'IPTG (inducteur de l'opéron lactose), les bactéries transformées par le plasmide sans l'insert peuvent cliver le X-Gal, *via* la β -galactosidase, et donc se colorer en bleu, tandis que celles transformées par le plasmide avec l'insert ne peuvent hydrolyser le X-Gal et donc restent blanches. Ces colonies blanches ont été alors récupérées et étudiées.

3.4.5 Analyse des clones recombinants par PCR sur colonie

Les clones sélectionnés ont été analysés par PCR sur colonie afin de vérifier la présence du gène d'intérêt sur le plasmide. L'amplification a été réalisée à l'aide de la Taq Polymérase avec le couple d'amorces spécifiques à la séquence étudiée (tableau III-4).

Nom	Séquence de l'amorce de 5'→3'	Tm (°C)
Amorce sens du gène d'intérêt	ATGGGGAAGATAATGGAATGGGCAGCAAGATC	63
Amorce antisens du gène d'intérêt	TCATCACAACCGCTTGGCTAAGAGTCTCAATG	62

Tableau III-4. Amorces utilisées pour amplifier le gène d'intérêt.

Une fraction de la colonie à étudier a été mélangée avec 25µl d'un mélange réactionnel PCR spécifique pour la Taq polymérase du laboratoire comme décrit précédemment (cf. paragraphe 3.2) à l'exception de l'étape de dénaturation initiale (95°C) qui dure 15 minutes au lieu de 5min. Les PCR ont été réalisées à la Tm des amorces (tableau III-4) avec un temps d'élongation de 1min. Les produits PCR ont été ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (cf. paragraphe 3.1.5).

Les clones positifs contenant la construction d'intérêt ont été cultivés dans 5 ml de LB plus ampicilline (100µg/ml), 16h à 37°C sous agitation (200 rpm). Chaque clone a ensuite été mis en collection dans 30% de glycérol et conservé à -80°C.

3.4.6 Vérification des clones recombinants par PCR

A partir des plasmides extraits de chaque clone positif (cf. paragraphe 3.1.3), une PCR a été réalisée à l'aide de la PhusionTM high-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes) selon le protocole décrit paragraphe 3.2. Les produits PCR ont été ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (cf. paragraphe 3.1.5).

Le séquençage des fragments amplifiés a été effectué dans un premier temps par l'entreprise Génome Express (Grenoble) puis à la plateforme de Génomique fonctionnelle de Bordeaux (Université Victor Segalen Bordeaux 2) selon le protocole Applied Biosystems sur séquenceur automatique.

La technique de séquençage utilisée est celle décrite par Sanger *et al.* (1977). Quatre réactions de PCR ont été menées parallèlement en présence d'une des quatre bases marquée par un fluorochrome spécifique sous forme de di-désoxyribonucléoside triphosphate et d'une seule amorce qui va déterminer le sens de séquençage. Le

séquençage réalisé à partir de plasmides transformés se fait avec différentes amorces en fonction de la séquence étudiée. Pour le plasmide pGEM®-T Easy, les amorces utilisées sont les amorces universelles M13 et M13 reverse.

Les analyses et les comparaisons des séquences ont ensuite été réalisées à l'aide des logiciels « DNA Baser » pour l'extraction des données et du logiciel DIALIGN2 (<http://bioinfo.hku.hk/services/menuserv.html>) pour les alignements de séquences.

3.4.7 Insertion du gène d'intérêt dans le vecteur pET-15b

3.4.7.1 Préparation du vecteur pET-15b

Le vecteur pET-15b (Novagen) a été dans un premier temps digéré par les enzymes de restrictions appropriées (Nco1 et Xho1) selon les prescriptions du fournisseur (Biolabs). Les digestions ont été réalisées dans un mélange réactionnel de 50 µl composé de 3 µg de vecteur, 1 U/µg d'enzymes de restrictions, 1X de tampon adéquat. Le mélange a été incubé 1h à 37°C, puis les enzymes de restrictions ont été inactivées à 65°C pendant 20 minutes. Les extrémités 5' du vecteur ont été déphosphorylées par action de la phosphatase alcaline (Biolabs) 0,05U/µg pendant 1h à 37°C. La réaction a ensuite été arrêtée par ajout de 5mM d'EDTA et par une incubation à 65°C pendant 20 minutes. Le vecteur a été ensuite purifié sur gel d'agarose et la quantité d'ADN ainsi que sa pureté ont été déterminées à l'aide d'un Nano Drop.

3.4.7.2 Préparation de l'insert

Le plasmide pGEM®-T Easy contenant l'ADNc d'At1g78690 a été digéré par Nco1 et Xho1 dans un volume final de 50µl de tampon 1X (10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM dithiothreitol, pH7,9) contenant 200ng de plasmide pGEM®-T Easy, 1U/µg d'enzymes de restrictions et 10µg de BSA (albumine de serum bovine). Le mélange a été incubé 1h à 37°C puis les enzymes ont été inactivées 20min à 65°C. Les inserts ont ensuite été analysés sur gel d'agarose (cf. paragraphe 3.1.5), purifiés (cf. paragraphe 3.1.4) et quantifiés avec un NanoDrop.

3.4.7.3 Ligation pET-15b::At1g78690 ADNc

La ligation a été réalisée dans un mélange réactionnel de 10µl en présence de 50ng de vecteur pET-15b digéré, de 150ng d'insert, 1X de tampon T4 DNA ligase, 1 unité de T4 DNA ligase (Biolabs). Le mélange réactionnel a été incubé toute la nuit à 4°C. Les bactéries

XL1 blue ont été transformées par choc thermique avec la totalité du milieu réactionnel de ligation.

3.4.7.4 Transformation de bactéries *E. coli* par choc thermique et sélection de clones contenant le plasmide pET-15b::At1g78690

Pour obtenir des bactéries thermocompétentes, une préculture a été réalisée dans 2,5 ml de milieu LB pendant une nuit sous agitation (200 rpm). La préculture a été diluée 100X dans un milieu SOB (2% bacto tryptone ; 0,5% bacto yeast extract ; 0,5% NaCl ; pH 7,2 ajusté avec du NaOH) et incubée à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 0,6. Toutes les étapes ultérieures ont été réalisées à 4 °C. La culture a été transférée dans 4 tubes Falcon de 50ml et stockée dans la glace pendant 10 minutes. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 4000 rpm pendant 10 min. Le culot de bactéries a été repris dans 20ml (par tube) de tampon TB (PIPES 0,1M ; pH 6,7 ; $MnCl_2$ 1M ; $CaCl_2$ 1M ; KCl 1M) et stocké dans la glace pendant 10 minutes. Les cellules ont été de nouveau sédimentées (4000 rpm, 10 min). Puis le culot a été repris dans 4ml de tampon TB contenant 300 μ l de diméthyl sulfoxyde (DMSO). Les 4ml de bactéries ont été aliquotés et ont été immédiatement congelés à -80 °C.

La transformation a été effectuée en incubant la totalité du milieu réactionnel de ligation avec 70 μ l de bactéries thermo compétentes à 4 °C pendant 30 minutes. Les bactéries ont subi alors un choc thermique pendant 2 minutes à 37 °C permettant de faire entrer le plasmide pET-15b::At1g78690. Après une incubation dans la glace de 5 minutes, la suspension a été incubée en présence de 1ml de LB 1h à 37 °C sous agitation (200 rpm). La suspension a ensuite été étalée sur boîte de Pétri contenant du LB et de l'ampicilline (100 μ g.ml⁻¹) et placée ensuite une nuit à 37 °C.

Les clones bactériens se développant ont été analysés par PCR sur colonie, à l'aide de la Taq polymérase du laboratoire (cf. paragraphe 3.4.5) afin de vérifier la présence du plasmide pET-15b::At1g78690 recombinant. Les clones positifs contenant la bonne construction ont été cultivés dans un milieu liquide LB + ampicilline (100 μ g/ml), 16h, 37 °C sous forte agitation (200 rpm) puis mis en collection dans un milieu LB contenant 30% glycérol et conservés à -80 °C. Comme pour la construction pGEM®-T Easy::AT1g78690, les plasmides pET-15b::At1g78690 ont été purifiés et le gène d'intérêt a été amplifié par PCR avec la Phusion™ high-Fidelity DNA polymérase (Finnzymes) selon le même programme PCR qu'au paragraphe 3.4.6. Après purification, les produits PCR ont été séquencés par la plateforme de génomique fonctionnelle de Bordeaux.

3.5 Clonage via la technologie GATEWAY™

3.5.1 Généralités

La technologie GATEWAY™ permet le transfert rapide de séquences d'ADN dans de multiples vecteurs en les maintenant orientés dans le bon cadre de lecture. Cette technologie est basée sur les propriétés de recombinaison « site spécifique » du phage λ .

Les fragments d'ADN d'intérêt bordés par les sites de recombinaison *attB* sont insérés dans des vecteurs contenant des sites de recombinaison compatibles (*attB* x *attP* et *attL* x *attR*) par une réaction catalysée par les enzymes BP Clonase™ ou LR Clonase™ (Invitrogen).

La réaction BP est donc une recombinaison entre les sites *attB* bordant les fragments d'ADN amplifiés au préalable et les sites *attP* contenus dans le vecteur pDONR™221, formant le vecteur d'entrée (VE). Cette recombinaison crée les sites *attL1* et *attL2* (figure III-12). Par la suite, le fragment d'intérêt présent dans le vecteur d'entrée peut être transféré dans n'importe quel vecteur de destination (VD) contenant les sites de recombinaison *attR* en mélangeant les deux plasmides en présence de la LR Clonase™ (figure III-12). Les 5 vecteurs de destination utilisés sont : pDEST™17, pK7WG2D, pK7WGY2, pK7YWG2, pKGWFS7 (cf paragraphe 2.3). La réaction LR consiste en une réaction de recombinaison entre les sites *attL* contenus dans le clone d'entrée et les sites *attR* contenus dans le vecteur de destination. Cette recombinaison crée de nouveau les sites *attB* de part et d'autre du fragment d'intérêt.

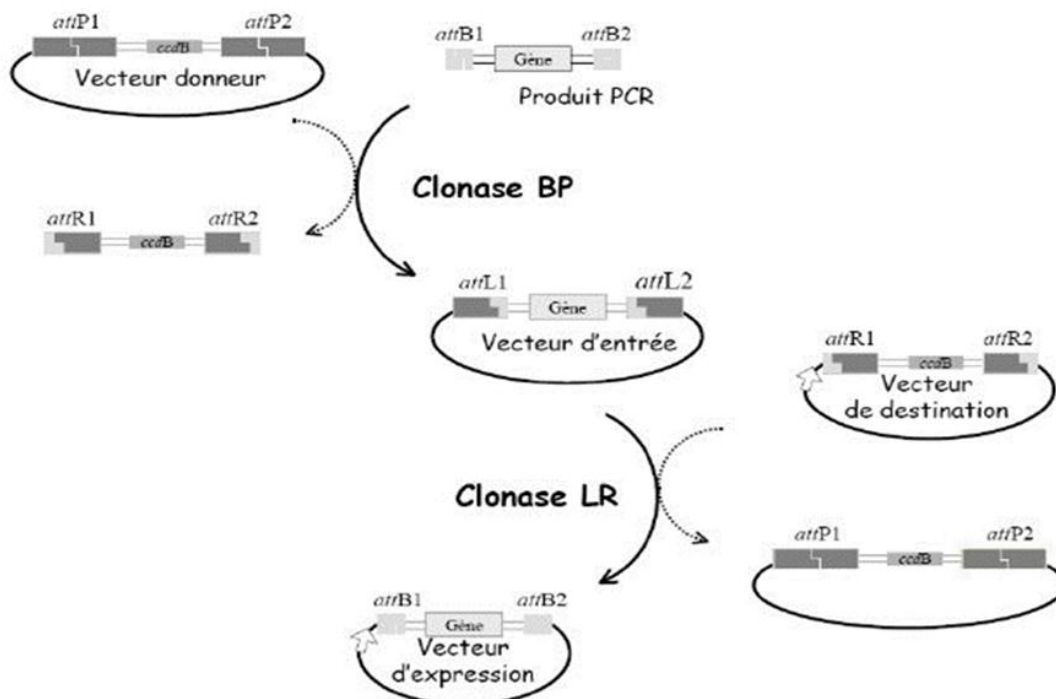


Figure III-12. Principe de clonage par la technologie GATEWAY™, les réactions BP et LR

3.5.2 Les amorces

Les amorces utilisées pour amplifier les fragments d'intérêt sont répertoriées dans le tableau III-5. Elles ont été dessinées selon le modèle suivant : la partie 5' de l'amorce (11 à 18 nucléotides) correspond à l'extrémité 3' des sites *attB1* pour les amorces sens et *attB2* pour les amorces antisens et la partie 3' correspond au fragment d'ADN à amplifier (18 nucléotides).

Il existe deux amorces pour amplifier le fragment du gène d'intérêt et une partie de la séquence *attB2* dont une a 2 bases du codon stop en moins pour conserver le cadre de lecture lors de la construction de la protéine d'intérêt fusionnée à la protéine EYFP.

Les amorces permettant d'insérer les sites *attB* (*attB1* et *attB2*) sont également répertoriées dans le tableau III-5.

Nom	Séquence de l'amorce de 5'→3'	Tm (°C)
<i>attB1</i> 78690 Sens	AAAAAGCAGGCTGGATGGGGAAGATAATGGAATG	56
<i>attB2</i> 78690 (-2bases du codon stop) Antisens	AGAAAGCTGGGTACAACCGCTTGGCTAAGAG	58
<i>attB2</i> 78690 Anti sens	AGAAAGCTGGGTTTCACAACCGCTTGGCTAAG	58
<i>attB1</i> Sens	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	60
<i>attB2</i> Anti sens	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	63

Tableau III-5. Amorces utilisées pour les clonages GATEWAY™

3.5.3 Construction du plasmide donneur

Dans un premier temps, l'ADNc du gène d'intérêt (At1g78690) a été amplifié par deux PCR successives avec la Phusion™ High-Fidelity DNA polymérase (cf. paragraphe 3.2) selon le programme décrit dans la figure III-13:

- Une première étape de 5 cycles de PCR avec le couple d'amorces permettant d'amplifier le fragment d'intérêt et une partie de la région *attB* a été réalisée (*attB1* 78690 et *attB2* 78690) (tableau III-5).
- Une seconde étape de 35 cycles a été réalisée avec les amorces permettant d'insérer les sites *attB* dans leurs intégrités (*attB1* et *attB2*) (tableau III-5).

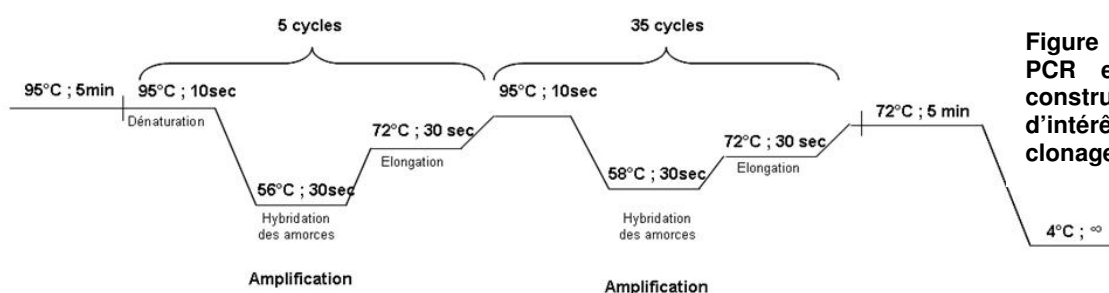


Figure III-13. Programme PCR employé pour la construction du fragment d'intérêt utilisé pour le clonage GATEWAY™.

Les fragments amplifiés ont été séparés par électrophorèse, découpés sur gel puis purifiés comme décrit précédemment.

3.5.4 La réaction BP

La réaction BP est une recombinaison entre les sites *attB* bordant le fragment de l'ADN d'intérêt et les sites *attP* contenus dans le vecteur pDONRTM221. Dans un tube eppendorf de 1,5 ml, 150ng de produit PCR préalablement obtenus sont ajoutés à 150ng du vecteur donneur (pDONR221) dans un volume de 8µl de tampon TE (pH8). 2 µl de la BP clonaseTM sont finalement ajoutés et l'ensemble est incubé à 25°C pendant 1 heure. Pour arrêter la réaction, 1µl d'une solution de protéinase K est ajouté au mélange avant d'être incubé à 37°C pendant 10 minutes.

3.5.5 Transformation des bactéries et sélection des clones transformés par le plasmide pDONR221TM::At1g78690

Comme pour la transformation des bactéries par le plasmide pET-15b::At1g78690, 1µl du mélange BP a été incubé en présence de 50µl de bactéries thermo compétentes (souche DH5α) à 4°C pendant 30 minutes. Les bactéries ont subi alors un choc thermique permettant de faire entrer le plasmide pDONR221TM::At1g78690 (cf. paragraphe 3.4.7.4). Les bactéries transformées ont été sélectionnées sur boîte de Pétri contenant du LB et de l'ampicilline (100µg.ml⁻¹) et placées ensuite une nuit à 37°C.

Afin de vérifier la présence du plasmide pDONR221TM::At1g78690, les clones bactériens s'étant développés ont été analysés par PCR sur colonie à l'aide de la Taq polymérase du laboratoire (cf. paragraphe 3.4.5). Les clones positifs contenant la bonne construction ont été cultivés dans un milieu liquide LB contenant de l'ampicilline (100µg/ml), 16h, 37°C sous forte agitation (200 rpm) puis mis en collection dans un milieu LB contenant 30% glycérol, et conservés à -80°C. Les plasmides ont été purifiés et le gène d'intérêt a été amplifié par PCR avec la PhusionTM high-Fidelity DNA polymérase (Finnzymes), selon le programme PCR décrit dans le paragraphe 3.2. Après purification, les produits PCR ont été séquencés par la plateforme de génomique fonctionnelle de Bordeaux.

3.5.6 La réaction LR

La réaction LR est la recombinaison entre les sites *attL* contenus dans le vecteur d'entrée et les sites *attR* contenus dans le vecteur de destination. La réaction est réalisée à partir de 4µl des produits de réaction BP préalablement obtenus, de 150ng de vecteur de

destination (par exemple le vecteur pK7WG2D), de 8µl de tampon TE (pH8) et de 2µl de la LR clonaseTM. La réaction est incubée 1h à 25°C. Comme pour la réaction BP, 1µl d'une solution de protéinase K est ajouté au mélange puis l'ensemble est incubé à 37°C pendant 10min pour inactiver la LR clonaseTM.

3.5.7 Transformation des bactéries et sélection des clones transformés par le plasmide de destination recombiné avec la séquence d'intérêt

De la même façon que pour la transformation avec le pDONR221TM::At1g78690, les bactéries *E.coli* C41 ou BL21 (DE3) thermocompétentes ont été transformées par choc thermique avec 1µl du mélange LR (cf. paragraphe 3.4.7.4). Les différents clones positifs ont été analysés par PCR puis stockés à -80°C.

4. Méthodes d'analyses des protéines

4.1 Dosage des protéines

Les quantités de protéines ont été déterminées par la méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) en utilisant une gamme étalon de 0 à 25µg de BSA (albumine de sérum bovin).

4.2 Electrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

La séparation des polypeptides en fonction de leur masse moléculaire par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS) (technique SDS-PAGE) a été décrite par Laemmli en 1970. Le système d'électrophorèse du laboratoire est le Mini Protean 3 cell (bio-Rad). Un cinquième de volume de tampon de charge 5X (Tris-HCl 150mM ; pH 6,8 ; DTT 500mM ; SDS 10% (p/v) ; bleu de bromophénol 0,5% (p/v) ; glycérol 60% (v/v)) a été ajouté aux échantillons protéiques à analyser. Les protéines ont été alors dénaturées par chauffage à 100°C pendant 5 minutes.

Le gel est composé de deux parties : un gel de séparation (Tris-HCl 375mM ; pH 8,8 ; acrylamide : N,N'-méthylène bisacrylamide (29:1) 12% (p/v) ; SDS 0,1% (p/v)) surmonté d'un gel de concentration (Tris-HCl 125mM ; pH 6,8 ; acrylamide : N,N'-méthylène bisacrylamide (29:1) 4% (p/v) ; SDS 0,1% (p/v)). La polymérisation des gels est induite par l'ajout de 0,05% (v/v) de TEMED et de 0,05% (v/v) de persulfate d'ammonium. L'électrophorèse a été effectuée à voltage constant (180V) pendant environ 1 heure dans un tampon Tris-HCl

25mM ; pH 8,3 ; glycine 192mM et SDS 0,1% (p/v). Après séparation, les polypeptides ont été transférés sur membranes (voir paragraphe 4.4) ou révélés en colorant le gel pendant une heure avec une solution composée de 0,04% (p/v) de bleu de Coomassie R250, de 45% (v/v) de méthanol et de 9% (v/v) d'acide acétique puis en le décolorant une nuit dans une solution de décoloration (Ethanol 30% (v/v), acide acétique 5% (v/v)).

4.3 Séquençage des protéines

Afin de confirmer la nature de la protéine purifiée par IMAC, des analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées à la plateforme de génomique fonctionnelle de Bordeaux.

4.4 Analyse par Western Blot

Suite à l'électrophorèse SDS-PAGE, les protéines ont été électrotransférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (membrane PVDF polyscreen, NEN).

Avant le transfert, le gel d'électrophorèse a été équilibré 15 minutes dans le tampon de transfert (Tris-HCl 25mM ; pH 8,3 ; glycine 192mM ; méthanol 20% (v/v)). Une membrane de PVDF a été découpée à la taille du gel et immergée quelques secondes dans du méthanol 100%. Après un abondant rinçage dans le tampon de transfert, elle a été placée au contact du gel et le transfert a été conduit une nuit à 4°C sous une tension constante de 30V à l'aide d'un appareil Mini Trans-blot Cell (Bio-Rad) dans un tampon glycine (Tris-HCl 25mM ; pH 8,3 ; glycine 192mM ; méthanol 20% (v/v)). Puis la membrane a été abondamment rincée à l'eau avant d'être colorée 10 minutes au rouge Ponceau afin de visualiser les protéines. Après quoi, elle a été rincée abondamment avec du TBS (Tris Buffer Saline : Tris-HCl 248mM ; NaCl 138mM ; KCl 27mM ; pH 7,4).

Afin d'éviter la fixation aspécifique des anticorps, la membrane a été incubée pendant une heure dans un tampon TBS en présence de 5% (p/v) de lait en poudre. Après un rinçage abondant avec du tampon TBS contenant 0,05% (p/v) de Tween 20, la membrane est placée pendant 2 heures à température ambiante dans une solution de TBS-lait 0,5% (p/v) en présence de l'anticorps primaire (IgG de souris dirigée contre un épitope constitué de 6-histidine (Clontech) ou IgG de souris anti-At1g78690, dilué au 1/2000^{ème} dans du TBS-lait 0,5% (p/v)). Après 4 lavages de 5 minutes avec du tampon TBS contenant 0,05% (p/v) de Tween 20, la membrane a été placée 1 heure à température ambiante dans un tampon TBS 0,5% (p/v) de lait contenant l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Clontech) dilué au 1/3000^{ème}. La membrane a été finalement rincée 5 fois avec du TBS-Tween et une fois avec du TBS. Les protéines d'intérêt ont été révélées grâce à la réaction

catalysée par la peroxydase : la membrane a été incubée une minute à l'obscurité en présence du luminol (Enhanced Luminol Reagent, NEN) et d'un réactif oxydant (Oxyding Reagent, NEN). Sous l'effet de la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire, le luminol est oxydé en présence de H_2O_2 . Le produit formé émet de la lumière au niveau de la bande protéique d'intérêt. L'émission de photons a été détectée à l'aide d'un film autoradiographique (Kodak Biomax Scientifique Imaging Film).

4.5 Obtention de l'anticorps anti-At1g78690

Après purification de la protéine d'intérêt (At1g78690p couplée à un motif 6HIS) et migration sur gel SDS-PAGE, la bande du gel d'acrylamide correspondant à la masse moléculaire attendue a été découpée et envoyée à l'entreprise COVALAB (<http://www.covalab.com/index.html>) afin d'obtenir un anticorps dirigé contre cette protéine.

5. Méthodes d'analyses des lipides

5.1 Extraction des lipides totaux de plantes

Pour analyser la composition lipidique en acides gras et en phospholipides des différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana*, les lipides ont été extraits selon un protocole adapté de la méthode de Folch (Folch *et al.*, 1957). Les tissus analysés ont été broyés dans 2 ml d'une solution de chloroforme/méthanol 2/1 (v/v). 500 µl d'eau ont été ajoutés avant que l'ensemble ne soit vigoureusement agité et centrifugé 10 minutes à 1000rpm. La phase organique a été prélevée et les lipides résiduels ont été extraits une deuxième fois par ajout de 2 ml de chloroforme à la phase aqueuse. Les phases organiques ont alors été regroupées.

5.2 Extraction des lipides totaux chez *E. coli*

Vingt ml d'une culture d'*E.coli* ont été prélevés. Les bactéries ont été sédimentées par centrifugation à 5000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé avec de l'eau. L'homogénat a été de nouveau centrifugé. Les bactéries ont alors été reprises dans 1 ml d'eau puis 2 ml de chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) ont été ajoutés. Ce mélange a été bien agité et centrifugé à 1000rpm pendant 10

minutes. La phase organique a été prélevée puis la phase aqueuse a été extraite de nouveau avec 2 ml de chloroforme. Les phases organiques ont alors été regroupées.

5.3 Séparation et dosage des lipides

5.3.1 Analyse des lipides par chromatographie sur couche mince (CCM)

Les lipides ont été séparés et purifiés par chromatographie sur couche mince (CCM) sur gel de silice (HPTLC silica gel 60 F²⁵⁴, Merck). Pour cela, les extraits lipidiques ont été évaporés à sec sous air (lipides *E. coli*) ou azote (lipides plantes) et repris dans 70 µl de chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v). Ils ont ensuite été déposés à l'aide d'un appareil de dépôt semi-automatique (Linomat IV, CAMAG). Plusieurs types de séparations ont été effectués :

- Le mélange « Vitiello » : chloroforme/ acétate de méthyle/ n-propanol/ méthanol/ KCl 0,25% (25/25/25/10/9 ; v/v) a été utilisé pour séparer les lipides polaires (Vitiello et Zanetta, 1978). Les cuves ont été mises à saturer avec le solvant 45 min avant la migration.
- Le mélange « Pyridine » : chloroforme/ pyridine/ acide formique (50/30/7, v/v) a été utilisé pour séparer les lipides polaires et plus particulièrement le PG et le PE (Weier *et al.*, 2005). Les cuves ont été mises à saturer avec le solvant 45 min avant la migration.
- Un mélange hexane 95%/ éther éthylique/ acide acétique/ acétone (50/40/1/10, v/v) (Chapman et Moore, 1993a) a été utilisé pour isoler les NAE des autres lipides. Les cuves ont été mises à saturer 30 minutes avant la migration.
- Un mélange hexane/éther éthylique/ acide acétique (90:15:2 ; v/v) a été utilisé pour séparer les lipides neutres (Juguelin *et al.*, 1986). Les cuves ont été mises à saturer avec le solvant 15 minutes avant la migration.
- Un mélange chloroforme/ méthanol/ hydroxyde d'ammonium (40:10:1 ; v/v) (Petersen *et al.*, 2000). Les cuves ont été mises à saturer 45 minutes avant migration.

Sur chaque plaque de CCM, des standards permettant l'identification des différents lipides ont été déposés. Après migration et séchage, les plaques ont été immergées dans une solution de primuline 0,01% (p/v) dans une solution acétone/eau (8/2, v/v). Les lipides sont ensuite visualisés par exposition des plaques à 366nm.

5.3.2 Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Après séparation par CCM, les bandes de silice correspondant aux différentes classes de lipides ont été grattées. Les phospholipides ont été transestérifiés par ajout de 1ml de méthanol sulfurique (2,5%) et chauffage à 80 °C pendant 60 minutes, pour permettre la synthèse d'esters méthyliques d'acide gras. Avant la transestérification, 5µg d'acide heptadecanoïque ont été ajoutés à chaque échantillon comme étalon interne. Les tubes ont été refroidis dans la glace puis les esters méthyliques ont été extraits par ajout de 500µl d'hexane 99% et de 1ml d'eau. Après une agitation manuelle vigoureuse pendant 20 secondes et une centrifugation de 5 min, la phase organique contenant les esters méthyliques a été récupérée dans une fiole CPG munie d'un insert. Les extraits ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (Hewlett Packard 5890 Série II) sur colonne Carbowax 15m x 0,53mm (Alltech) par un détecteur à ionisation de flamme (FID). La température du four a été programmée pour une minute à 160 °C, suivie d'une incrémentation de température de 20 °C/min jusqu'à 190 °C puis une seconde d'incrémentation de 5 °C/min jusqu'à 210 °C. Cette température a été maintenue pendant 6 minutes. Les temps de rétention des esters méthyliques ont été déterminés par comparaison avec des standards.

5.3.3 Analyse des lipides par ESI-MS/MS

Ces analyses ont été réalisées dans le laboratoire de « spectrométrie de masse des macromolécules biologiques », plateforme de spectrométrie de masse de l'IECB, dirigé par le professeur Jean-Marie Schmitter (Université de Bordeaux UMR 5248 CNRS-UBX1-ENITAB). Les extraits lipidiques issus des bactéries *E. coli* C41 transformées par le plasmide pET-15b::At1g78690 ont été analysés à l'aide d'un spectromètre de masse (LCQ ADVANTAGE, Thermo Fisher ®) couplé à une source ESI (electrospray ionisation) et muni d'une trappe ionique. Les lipides ont été dilués au 1/10^{ème} avec une solution de méthanol et injectés directement dans la trappe à l'aide d'une pompe à seringue avec un débit de 300µl.h⁻¹. Les lipides ont été ionisés par la technique d'électro spray ionisation (ESI) qui consiste à préparer les échantillons pour la spectrométrie de masse (MS) en formant des ions en phase gazeuse. Le voltage du spray utilisé a été de 4,5kV, le capillaire a été soumis à un voltage de 10V et à une température de 200 °C. Les analyses de spectrométrie ont été réalisées en tandem avec une trappe ionique, remplie d'hélium sous 0,1 Pa de pression, par CID (collision induced dissociation). Une fois les données recueillies, elles ont été analysées à l'aide du logiciel XcaliburTM.

5.3.4 Quantification des lipides marqués au [¹⁴C]

Après les tests d'activités *in vitro*, la radioactivité des lipides marqués au carbone 14 a été analysée, après 16 heures d'exposition des plaques CCM dans une cassette, à l'aide d'un Phosphorimager (PhosphorImager SI, Molecular Dynamics). La radioactivité a ensuite été quantifiée à l'aide du logiciel ImageQuant en utilisant une gamme étalon déposée sur une plaque exposée dans la même cassette.

5.4 Test à la PLD de *S.Chromofuscus*

Une extraction lipidique à partir de 100 ml de culture de bactéries *E. coli* C41(DE3) transformées par le plasmide pET-15b contenant l'ADNc du gène At1g78690 ou transformées par le plasmide vide a été réalisée. Après séparation par CCM (cf. paragraphe 5.3.1) à l'aide du système de solvant « Vitiello » et visualisation (primuline), la bande de silice correspondant à la NAPE a été grattée puis transférée dans un tube. 500µl d'eau ont été ajoutés et le mélange eau/silice a été placé dans un bain à sonication pendant 1 à 2 minutes afin de réduire la silice à l'état de poudre. Ensuite, 2ml de chloroforme/méthanol (2:1 ; v/v) ont été ajoutés pour extraire les lipides (cf. paragraphe 5.2). Après évaporation sous un flux d'air, les lipides ont été repris dans 1ml de diéthylether. 200µl de tampon MES (40mM (Méthyl Ester Sulfonate) ; CaCl₂ 15mM ; pH 5,5) contenant 62,5 unités de PLD de *Streptomyces chromofuscus* (Sigma St Louis, MO) ont été ajoutés formant ainsi un système biphasique. Le milieu réactionnel a été incubé à 32°C, 160 rpm pendant 2 heures (Chapman et Moore, 1993a). La réaction a été stoppée par ajout de 2ml de chloroforme/méthanol (2:1 ; v/v). Puis, 500µl d'eau ont été ajoutés et les lipides ont été extraits et analysés par CCM (cf. paragraphe 5.3.1) en utilisant le mélange « Vitiello » comme système de solvants.

6. Méthodes d'études de l'activité NAPE synthase *in vitro*

6.1 Expression de la protéine At1g78690-6HIS

Les bactéries C41(DE3) (Novagen) transformées par le plasmide pDEST17 contenant la séquence ADNc du gène At1g78690 ont été cultivées à 37°C sous agitation (200 rpm) dans du milieu LB contenant de l'ampicilline 100µg/ml jusqu'à l'obtention d'une DO_{600nm} de 0,6. L'expression de la protéine a été induite par l'ajout d'IPTG à une

concentration finale de 1mM, pendant 3h à 30°C. Un gel SDS-PAGE a été réalisé à partir de 100µl d'extrait total de cette culture pour vérifier la présence de la protéine d'intérêt.

Le vecteur de destination pDEST17 permet d'ajouter en Nter de la protéine d'intérêt une étiquette de 6 Histidines (6-HIS). La construction pDEST17::At1g78690 a été réalisée *via* une réaction LR entre le vecteur d'entrée pDONR221TM::At1g78690 et le vecteur de destination pDEST-17 (clonage GATEWAY, cf. paragraphe 3.5).

6.2 Solubilisation et purification de la protéine recombinante At1g78690-6HIS

6.2.1 A l'aide d'un ÄKTAexplorer

La culture bactérienne préalablement réalisée a été placée pendant 20 minutes à 4°C. Les bactéries ont été ensuite centrifugées à 5000 rpm pendant 10 minutes (à 4°C). Le culot a été placé à -20°C pendant 16 heures. Il a été ensuite resuspendu à l'aide de 15ml de tampon d'équilibration (Tris HCl 50mM ; NaCl 0,5M ; pH 8 ; avec ou sans 8mM de CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate) en fonction des expériences, concentration micellaire critique = 4-6mM). Afin d'inhiber les protéases, la moitié d'une pastille de cocktail anti-protéases (Proméga) a été ajoutée à la préparation. L'homogénat a été dans certains cas soniqué 6 fois à l'aide d'une microsonde pendant 30sec à une puissance de 22W avec une minute de pause à 4°C entre chaque sonication. Afin d'inhiber les protéases, 1mM de PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride) a été ajouté à la solution après la première sonication. L'homogénat a été ensuite centrifugé à 13000g pendant 20minutes à 4°C. La purification de la protéine a été ensuite réalisée par chromatographie sur colonne IMAC (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography) à l'aide d'un ÄKTAexplorer. L'élution de la protéine d'intérêt a été réalisée par un gradient de concentration avec une solution d'élution (Tris HCl 50mM ; imidazole 0,5M ; avec ou sans 8mM de CHAPS en fonction des expériences, pH 8).

Afin de vérifier l'enrichissement en protéine d'intérêt lors de l'élution, une électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes a été réalisée (cf. paragraphe 4.2).

6.2.2 A l'aide du kit Sepharose 6 Fast FlowTM

La culture bactérienne C41(DE3) contenant le plasmide pDEST17::At1g78690 a été réalisée de la même façon qu'au paragraphe 6.1. Une fois l'expression des protéines induite, la culture a été placée 20 minutes dans la glace puis elle a été centrifugée à 5000 rpm, 10 minutes à 4°C. Le culot bactérien a été lavé à l'eau stérile, puis les cellules ont été de

nouveau culotées (5000rpm, 10 minutes à 4°C). Le culot bactérien a été stocké à -20°C pendant 16 heures. A partir de ce moment, toutes les étapes ultérieures ont été réalisées à 4°C. Le culot a été repris dans un tampon de solubilisation (tampon phosphate 20mM ; NaCl 0,5M ; imidazole 25mM ; n-Dodecyl β -D-maltoside (DDM) 2mM ; pH 8) et placé sous agitation pendant une heure. L'homogénat a été alors centrifugé à 13 000g, pendant 20 minutes à 4°C.

La purification de la protéine d'intérêt a été réalisée par chromatographie d'affinité sur colonne IMAC à l'aide du kit Ni Sepharose 6 Fast Flow™ (Amersham) en ajoutant dans un premier temps le surnageant (solubilisé) obtenu au gel de sépharose complexé à du Nickel. Après une heure, le gel a été « packé » dans une colonne. qui a ensuite été lavée en y faisant passer x ml de tampon d'équilibration (tampon phosphate 20mM, 0,5M NaCl, 25mM imidazole, 0,2mM DDM, pH 8) avec un débit de 1ml.min⁻¹. L'élution de la protéine étiquetée a été effectuée avec une solution à 250mM d'imidazole (tampon phosphate 20mM ; NaCl 0,5M ; DDM 0,2mM ; imidazole 250mM ; pH 8) à un débit de 1ml.min⁻¹. Le volume de chaque fraction récoltée est de 1ml. Afin de vérifier l'enrichissement en protéine d'intérêt lors de l'élution, des électrophorèses monodimensionnelles en conditions dénaturantes ont été réalisées (cf. paragraphe 4.2).

6.3 Etude *in vitro* de l'activité NAPE-synthase de la protéine At1g78690-6HIS

Les protéines purifiées ont été utilisées pour étudier l'activité NAPE synthase *in vitro*. Les réactions ont été réalisées dans un volume réactionnel de 100-500 μ l contenant du tampon phosphate dont la composition varie en fonction des expériences, de 1nmol de différents donneurs d'acyles marqués au carbone 14, de 1nmol de PE et de différentes quantités de protéines purifiées. Les réactions se sont déroulées à 30°C ou 40°C, 120 rpm, pendant des temps variables et ont été arrêtées par addition de 2ml de chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) suivi de l'ajout de 500 μ l d'eau. Les lipides polaires ont été extraits, séparés par CCM et la quantité de [¹⁴C]-NAPE synthétisée a été déterminée à l'aide d'un PhosphorImager (cf. paragraphe 5.3.4).

6.4 Préparation des membranes d'*E.coli*

Les cellules d'*Escherichia coli* C41(DE3) transformées par le plasmide pET-15b::At1g78690 ont été mises en préculture dans 5ml de milieu LB contenant 100 μ g/ml d'ampicilline pendant une nuit sous agitation (200 rpm) à 37°C. 2,5ml de cette préculture ont été utilisés pour ensemercer 47,5ml de milieu LB contenant 100 μ g.ml⁻¹ d'Ampicilline. La culture a été réalisée à 37°C sous agitation (200 rpm) jusqu'à obtention d'une DO_{600nm} de

0,6. Les protéines ont été exprimées par ajout d'IPTG concentration finale de 1mM. La culture a été alors incubée à 30°C sous agitation (200 rpm) pendant 3 heures. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 5000 rpm, pendant 10 minutes à 4°C puis les membranes ont été préparées.

Le culot de bactéries *E. coli* C41 transformées par le plasmide pDEST17::At1g78690 a été resuspendu dans 2,5 ml de tampon 0,2M de Tris-HCl (pH8). Ensuite, 2,5ml de tampon contenant : 0,2M de tampon Tris-HCl, 1M de saccharose et 1mM d'EDTA ont été ajoutés à la suspension cellulaire ainsi que 25µl de lysozyme (1mg.ml⁻¹) et 10ml d'eau. Le mélange a été incubé 30min à température ambiante sous agitation douce. A partir de là, toutes les étapes ultérieures ont été effectuées à 4°C. Les membranes ont ensuite été récupérées par centrifugation 20min à 150 000g (SORVALL DISCOVERY M120SE). Le culot de membranes a été repris dans un tampon Tris-HCl 50mM (pH 8). La suspension a été homogénéisée à l'aide d'un potter verre-téflon puis par plusieurs passages au travers de l'aiguille d'une seringue (diamètre 0,5mm). Les membranes ont été ensuite de nouveau centrifugées 20min à 150 000g à 4°C et le culot ainsi obtenu a été repris dans 3ml de tampon Tris-HCl 50mM (pH8). Après une nouvelle étape d'homogénéisation de la suspension (potter verre-téflon et aiguille), les membranes ont été conservées sous forme de fractions aliquotées à -20°C. Les protéines membranaires ont été dosées par la méthode de Lowry (cf. paragraphe 4.1).

6.5 Etude de l'activité NAPE synthase sur les membranes d'*E. coli*

Les réactions ont été réalisées dans un volume réactionnel de 100µl contenant du tampon phosphate 10mM (pH 8), différents donneurs d'acyles marqués au carbone 14, et différentes quantités de protéines membranaires. Le milieu réactionnel a été incubé à 30°C, à 120 rpm pendant des temps variables. La réaction a été stoppée par addition de 2ml de chloroforme/méthanol (2:1, v/v) suivi de l'ajout de 500µl d'eau. Les lipides polaires ont été extraits, séparés par CCM et la quantité de NAPE radiomarkée a été déterminée à l'aide d'un PhosphorImager (cf. paragraphe 5.3.4).

7. Méthodes de transgénèse chez *A. thaliana*

7.1 Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

Pour obtenir des agrobactéries thermocompétentes, une culture d'agrobactéries a été réalisée pendant une nuit sous agitation (170 rpm) dans 5 ml de milieu LB contenant de la

spectinomycine et de gentamycine (tableau III-1). Deux ml de cette préculture ont ensuite été utilisés pour ensemer 50 ml de milieu LB contenant toujours les mêmes antibiotiques. La culture a été arrêtée lorsque la DO_{600nm} a atteint la valeur de 0,6. Les bactéries ont été placées 15 min dans la glace puis centrifugées 10 min à 5000g. Le culot de cellules a été repris dans 1,5 ml de $CaCl_2$ (0,1M) puis aliquoté.

La transformation d'agrobactéries par choc thermique a été réalisée en ajoutant environ 1µg de plasmide à 50µl de cellules compétentes. Le mélange a été incubé 5 min dans de la glace, 5 min dans de l'azote liquide puis 5 min à 37°C. Les agrobactéries ont été ensuite mises en culture dans 1ml de LB pendant 4h à 28°C sous agitation avant d'être étalées sur milieu LB gélosé contenant les antibiotiques appropriés à la sélection.

Pour les agrobactéries électrocompétentes, la méthode de transformation est identique à celle utilisée pour *E. coli* (cf. paragraphe 3.4.3).

7.2 Transformation stable d'*Arabidopsis thaliana* par *Agrobacterium*

Deux souches de bactéries ont été utilisées pour ces transformations stables. La première correspond à une souche transformée par le plasmide pK7WG2D::At1g78690 permettant la surexpression de la protéine d'intérêt chez *A. thaliana* (35S::At1g78690). La seconde est une souche d'*Agrobacterium* contenant le plasmide pK7GWFS7::At1g78690, utilisé pour l'étude de l'activité du promoteur du gène d'intérêt via un test histochimique à la β-glucuronidase (PA1g78690::GUS). Ces vecteurs de destination (pK7WG2D::At1g78690 et pK7WFS7::At1g78690) ont été obtenus par clonage GATEWAY comme décrit paragraphe 3.5.

La transformation stable des plantes d'*Arabidopsis thaliana* a été réalisée par « Floral dipping » (Clough et Bent, 1998). Pour cela, une préculture de 2 ml d'une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* a été réalisée pendant 8 heures (30°C, 180 rpm). Ensuite, 8 ml de milieu ont été ajoutés et la culture a été poursuivie toute la nuit. Le lendemain, 40 ml d'une solution d'infiltration (saccharose 10% (p/v), Silwett L77 à 0,05% (v/v)) ont été ajoutés à la culture.

Les parties aériennes des plantes d'*Arabidopsis thaliana* écotype Col0 ou SALK 029716, privées d'arrosage depuis plus de 24h présentant des bourgeons floraux, ont été immergées 30 secondes à 1 minute dans cette solution d'infiltration contenant les agrobactéries. L'excès de solution restant sur les plantes a été éliminé à l'aide de papier absorbant. Un film plastique a été placé autour des plantes pendant 24 heures pour maintenir un taux d'humidité élevé. Cette opération a été répétée 3 fois à une semaine d'intervalle entre chaque immersion afin d'augmenter la quantité de graines transformées.

Les plantes ont été ensuite cultivées jusqu'à la formation des graines. Les graines issues des plantes transformées ont été récoltées et les lignées transformées ont été sélectionnées sur milieu gélosé contenant de la kanamycine à $75\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

7.3 Méthodes d'analyses des *Arabidopsis* mutantes

7.3.1 Sélection par PCR d'une lignée homozygote pour l'insertion de l'ADN-T chez les plantes mutantes SALK 029716

Les amorces de PCR ont été choisies à l'aide de l'outil de design d'amorces disponible sur le site internet SIGnAL (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Trois amorces ont été utilisées : une amorce dans l'ADN-T (LB), une amorce dans la séquence génomique à droite du site d'insertion de l'ADN-T (RP) et une amorce à gauche du site d'insertion de l'ADN-T (LP) (tableau III-6 ; figure III-14)).

Nom	Séquence de l'amorce de 5'→3'	Tm (°C)
RB Sens	CGCAATAATGGTTTCTGACGTA	54
LP1 sens	TCTCCTGTGTATCCTCTCGTGTG	57
RP1 Anti sens	TCAGATCTTGCTGCCCATTCC	54

Tableau III-6. Amorces utilisées pour la sélection par PCR d'une lignée homozygote chez *A. thaliana* pour l'insertion de l'ADN-T dans la séquence du gène d'intérêt.

Deux PCR ont été réalisées sur l'ADN génomique extrait des plantes à tester : une avec les amorces LP/RP et une autre avec les amorces LB/RP. Un seul produit de PCR est obtenu avec le couple d'amorces LP/RP dans le cas des lignées homozygotes sauvages. Pour les lignées hétérozygotes, deux amplifiats sont produits : l'un avec le couple LP/RP et l'autre avec le couple LB/RP. Les PCR réalisées avec les homozygotes mutants produisent un seul amplifiat avec les amorces LB/RP et aucun amplifiat avec le couple LP/RP (Figure III-14).

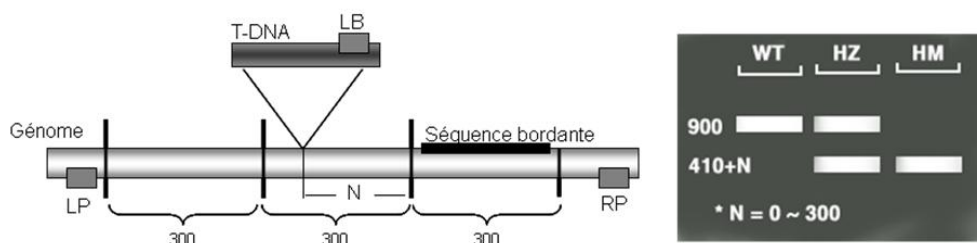


Figure III-14. Méthode utilisée pour la détermination du génotype des mutants d'insertion de l'ADN-T. LP, RP et LB désignent les amorces utilisées pour les PCR. N correspond à la distance entre le site d'insertion de l'ADN-T et la position de la séquence bordante ayant été séquencée par le Salk Institute. Les PCR effectuées avec les amorces LP et RP donnent un produit d'amplification d'environ 900pb avec l'ADN génomique de lignées sauvages ou hétérozygotes. Celles effectuées avec les amorces LB et RP ou LP donnent un produit d'amplification de 410 + N pb avec les lignées homozygotes mutantes ou hétérozygotes. WT : lignée sauvage ; HZ : lignée hétérozygote ; HM : lignée homozygote mutante.

Une fois les lignées mutantes homozygotes sélectionnées, le produit de la réaction de PCR réalisée avec les amorces LB et LP ou RP a été séquencé pour préciser le site exact d'insertion de l'ADN-T. L'absence du transcrit total correspondant au gène muté n'est étudié qu'une fois ces contrôles effectués. Le nombre d'insertions indépendantes d'ADN-T n'a pas été vérifié dans les lignées mutantes. La présence d'insertions supplémentaires n'est donc pas à exclure. Le SIGnAL estime que 50% des lignées ADN-T ayant été générées possèdent plus d'une insertion.

7.3.2 Sélection des plantes transformées par « floral dipping »

Les plantes transformées par « floral dipping » avec les bactéries *Agrobacterium*, possédant le plasmide pK7WG2D::At1g78690 ou le plasmide pKGWFS7::At1g78690, sont résistantes à la kanamycine. Pour sélectionner des plantes homozygotes pour l'une ou l'autre des transformations, les graines obtenues ont été semées sur milieu MS (cf. paragraphe 2.1.3 et 2.1.4) plus kanamycine ($75\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Les graines de chaque lignée indépendante sont récoltées et les nouvelles générations sont également semées sur un milieu MS complété à la kanamycine jusqu'à l'obtention d'une lignée homozygote, c'est-à-dire d'une lignée dont 100% de la descendance est kanamycine résistante.

7.4 Expression transitoire dans des cellules d'épiderme de feuille de tabac

L'infiltration d'*A. tumefaciens* dans des feuilles de tabac a été réalisée selon la méthode décrite par Batoko *et al.*, (2000). Les clones d'*A. tumefaciens* transformés pour le plasmide pK7WGY2::At1g78690 ou pK7YWG2::At1g78690 ont été cultivés jusqu'en fin de phase exponentielle et ont été resuspendus dans un volume de tampon d'infiltration (MES 50mM ; Na_3PO_4 2mM ; glucose 0,5% (p/v) ; acétosyringone $100\mu\text{M}$; pH 5,6) jusqu'à l'obtention d'une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,2.

Les plasmides pK7WGY2 (permettant l'expression de la protéine d'intérêt fusionnée en Nter avec la protéine EYFP) et pK7YWG2 (permettant l'expression de la protéine d'intérêt fusionnée en Cter avec la protéine EYFP) ont été réalisés par clonage GATEWAY comme décrit paragraphe 3.5.

Chaque suspension bactérienne a été infiltrée sur la face inférieure de différentes feuilles matures de tabac *Nicotiana tabacum* (au stade 6-8 feuilles matures) à l'aide d'une seringue sans aiguille. Des zones infiltrées de 3 à 6 cm^2 ont été obtenues et repérées à l'aide d'un marqueur. L'expression des transgènes a été vérifiée 2 jours après l'infiltration par observation de la fluorescence au microscope confocale (cf. paragraphe 7.5).

7.5 Analyse de l'expression des protéines de fusion At1g78690-EYFP par microscopie confocale

Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal LEICA TCS SP2 avec AOBS (laser Argon : 458, 476, 488, 514 nm, He-Ne vert : 543 nm, He-Ne rouge : 633 nm, diode UV : 405 nm), équipé d'une caméra SPOT RT-KE SLIDER et d'un logiciel de commande de la motorisation en z. Les images ont été analysées à l'aide du logiciel d'analyses d'images Image Pro Plus (Media Cybernetics).

Des co-expressions avec un marqueur de la membrane plasmique ont été réalisées pour confirmer la localisation subcellulaire de la protéine At1g78690p. Le marqueur utilisé a été le marqueur PMA4-EGFP.

L'observation simultanée des sondes fluorescentes EGFP et EYFP a nécessité une sélection rigoureuse des filtres pour discriminer les deux signaux de fluorescence lors de l'observation au microscope confocal. Effectivement, les spectres d'émission et d'excitation de ces deux chromophores sont très proches. L'EYFP est excitée à 514 nm et la fenêtre de détection de son émission de fluorescence est entre 530 et 550 nm. Pour l'EGFP, l'excitation est réalisée à 488 nm et la fenêtre de détection est plus étroite entre 490 et 500 nm. L'acquisition des images a alors été réalisée en mode séquentiel : les fluorophores ont été excités l'un après l'autre pour éviter l'excitation de l'EYFP lorsque l'EGFP est excitée. De plus des filtres ont été utilisés pour permettre à la fluorescence de l'EYFP d'être visualisée en rouge. Ceci permettant ensuite de pouvoir superposer les images obtenues en EYFP et EGFP afin d'observer un signal jaune en cas de co-localisation.

7.6 Marquage histochimique GUS (β -glucuronidase)

Afin de déterminer le profil d'expression du promoteur du gène d'intérêt At1g78690 chez *A. thaliana*, des tests histochimique GUS ont été réalisés sur différents organes de plantes transgéniques transformées par « floral dipping » via *Agrobacterium tumefaciens* transformées par le plasmide pKGWFS7 contenant le promoteur du gène d'intérêt. La construction de ce plasmide a été réalisée par clonage Gateway par recombinaison entre le plasmide pDONR221 contenant le promoteur du gène d'intérêt, c'est-à-dire les 1000pb en amont du premier ATG du gène, avec le vecteur de destination pKGWFS7 (cf. paragraphe 3.5).

Les tissus à analyser ont été incubés 20 minutes à 4°C dans 500µl d'acétone 90% (v/v) puis rincés par 3 lavages successifs avec du tampon phosphate 100mM ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$ 170mM ; NaH_2PO_4 3mM ; pH7). Un ml de tampon de réaction (phosphate 100mM ; X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide) 1mM ; potassium ferricyanide

0,5mM ; potassium ferrocyanide 0,5mM ; Triton X-100 0,5% (v/v)) a été ajouté. La réaction a été effectuée à 37°C jusqu'à la coloration des tissus (maximum 24 heures). La réaction a été arrêtée en rinçant les échantillons avec une solution de tampon phosphate 100mM au moins 5 fois. Puis les tissus ont été traités avec une solution d'éthanol à 70% pour éliminer la chlorophylle potentiellement présente dans nos échantillons. Les tissus ont été conservés à 4°C dans de l'éthanol 70%. L'observation des tissus et l'acquisition des images ont été effectuées avec un stéréomicroscope LEICA MZ FL III équipé d'une caméra numérique LEICA (model DC 300F).

8. Analyse phénotypique

8.1 Analyse de phénotype racinaire

Afin d'étudier la taille des racines entre les différentes lignées « 35S », ADN-T et Col0, des cultures sur boîtes verticales ont été réalisées. Des boîtes (10cmx10cm) contenant 35ml de milieu de culture (4,4g.l⁻¹ de milieu MS ; 0,5g.l⁻¹ MES et 7g.l⁻¹ d'agar à pH 5,8) ont été utilisées pour ces expériences. Une fois stérilisées (paragraphe 2.1.3), douze graines ont été semées en une seule ligne à 2 cm du bord supérieur de la boîte (figure III-15). Afin d'homogénéiser les conditions de culture, deux lignes de graines ont été semées dans une même boîte. Les boîtes ont été ensuite placées à 4°C pendant 48h afin de synchroniser la germination des graines et de lever leur dormance. Les racines ont été mesurées à intervalles de temps réguliers manuellement ou à l'aide du logiciel Image J.

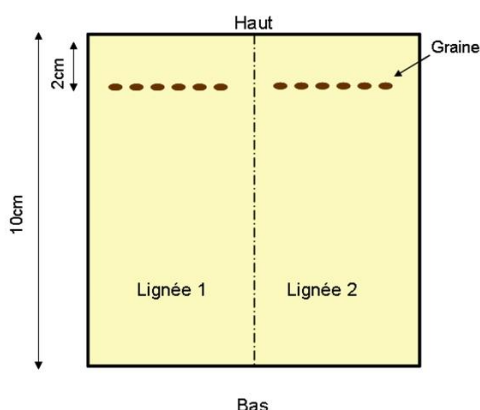


Figure III-15. Représentation schématique de la culture sur boîte verticale des graines de différentes lignées d'*Arabidopsis thaliana*.

8.2 Culture de plantes sur milieu $\pm$ saccharose

Afin de comparer le taux et la vitesse de germination des différentes lignées de graines (« 35S », ADN-T et Col0), des graines ont été semées sur milieu enrichi ou non en saccharose (10g.l⁻¹) (cf. paragraphe 2.1).

PARTIE IV

RESULTATS-DISCUSSIONS

Résultats

1. Etudes bioinformatiques

1.1 Recherche « *in silico* » de nouveaux gènes codant pour des acyltransférases putatives d'*Arabidopsis thaliana*

1.1.1 Criblage réalisé dans la base de données du TAIR à partir de la séquence YPR140wp de *Saccharomyces cerevisiae*

Comme nous l'avons vu dans la partie « Données Bibliographiques », de nombreuses acyltransférases (LPAAT, G3PAT...) ont pu être caractérisées dans plusieurs organismes. Une nouvelle acyltransférase, la première lysophosphatidylcholine acyltransférase (YPR140wp) de *Saccharomyces cerevisiae*, a notamment été caractérisée par le laboratoire de biogenèse membranaire (Testet *et al.*, 2005). A partir de cette séquence protéique, une étude bioinformatique a été effectuée sur le site du TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>), en utilisant le programme BLASTp, afin d'identifier de nouvelles séquences correspondant potentiellement à des acyltransférases chez le modèle *Arabidopsis thaliana*. Deux protéines, At3g05510p et At1g78690p, présentant une homologie significative avec la protéine YPR140wp, ont été retenues (figure IV-1). Le travail de cette thèse a consisté en l'étude exclusive d'At1g78690p.

Sequences producing significant alignments:			Score (bits)	E Value
AT1G78690.1	Symbols: phospholipid/glycerol acyltransfe...		82	7e-16
AT3G05510.2	Symbols: phospholipid/glycerol acyltransfe...		80	2e-15
AT3G05510.1	Symbols: phospholipid/glycerol acyltransfe...		79	6e-15
AT3G17430.1	Symbols: phosphate translocator-related ...		31	0.96
AT1G13560.2	Symbols: AAPT1, ATAAPT1 AAPT1 (AMINOALCOHOL...		30	2.8
AT1G13560.1	Symbols: AAPT1, ATAAPT1 AAPT1 (AMINOALCOHOL...		30	3.0
AT2G32560.1	Symbols: F-box family protein chr2:13824...		29	4.2
ATMG00670.1	Symbols: ORF275 hypothetical protein chrM...		28	5.2
AT1G27320.1	Symbols: AHK3 AHK3 (ARABIDOPSIS HISTIDINE K...		28	6.5
AT1G26870.1	Symbols: FEZ, ANAC009 FEZ (FEZ); transcript...		28	6.8
AT3G03773.2	Symbols: FUNCTIONS IN: molecular_function ...		28	9.3

Figure IV-1. Identification des séquences protéiques d'*Arabidopsis thaliana* présentant des homologies avec la séquence protéique YPR140wp dans la base de données du TAIR à l'aide du programme BLASTp (<http://www.arabidopsis.org/Blast/>). La partie encadrée montre les séquences ayant une E-Value significative.

1.1.2 Recherche de motifs consensus à partir de la séquence de la protéine At1g78690p

Les informations obtenues grâce à la banque de données du TAIR permettent d'attribuer une fonction phospho/glycérol acyltransférase putative à At1g78690p. L'analyse de la séquence de cette protéine sur le site PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/search>) a confirmé l'appartenance possible de cette protéine à cette famille d'enzymes. L'alignement de la protéine At1g78690p avec la protéine YPR140wp, via le logiciel Clustal W, a permis de préciser les régions conservées entre ces deux séquences. Comme nous l'avons vu dans la partie « Données Bibliographiques », une étude réalisée par Lewin *et al.* (1999) a rapporté la présence de quatre régions très conservées impliquées dans l'activité catalytique des acyltransférases. Les régions fortement homologues entre la protéine At1g78690p et YPR140Wp correspondent à plusieurs de ces domaines caractéristiques : le motif [NX]-H-[RQ]-S-X-[LYIM]-D (NHX₄D, bloc 1), le motif F-[PLI]-E-G-[TG]-R-[SX]-[RX] (nommé bloc 3), et le motif [VI]-[PX]-[IVL]-[IV]-P-[VI] (dit bloc 4). Des expériences de mutagenèse dirigée en utilisant comme modèle d'acyltransférase une G3P-AT d'*E. coli*, ont montré que les résidus Histidine (H) et Aspartate (D) du bloc 1, ainsi que les résidus Glycine (G) du bloc 3 et Proline (P) du bloc 4 jouent un rôle important dans l'activité catalytique de ces enzymes (Lewin *et al.*, 1999). Il est possible de retrouver ces différents résidus dans les motifs des blocs 1, 3 et 4 de la séquence de la protéine At1g78690p (bloc 1: NHMSTLD, bloc 3 : FPEG, et block 4 : PIVLPI (figure IV-2)). En revanche le résidu Sérine (S) du bloc 3 qui serait impliqué dans la liaison de l'acyl accepteur (Lewin *et al.*, 1999) n'est pas présent dans le bloc 3 de la protéine. Ceci suggère une activité acyltransférase de la protéine At1g78690p différente des activités G3P-AT et lysolipide acyltransférases caractérisées jusqu'alors.

```

1  At1g78690p          381    1 à    381
2  Ypr140wp           381    1 à    381

      10      20      30      40      50      60
1  -----MGKIMEWAARSDHLGGIPRNTVIMAVSAFAKAVANLCNKSSVHNADTLMNL
51
2  MSFRDVLERGFLEAYPRRSPLWRFLSYSTSLTLFGVSKLLLFCTCYNVKLNGFEKLETA
60
C  ::::::::::::::E:::R:::L::::::::::::::::::K:::::C::::::::::::L:::

      70      80      90      100     110     120
1  VQ-SRPPGVP LITVSNHMSTLDDPVMWGAFKGLLSLDPELARWVLAEDICFRNPIFS YI
110
2  LERSKRENRG LMTVMNHMSMVDDPLVWATLPYKLFTSLDNIRWSLGAHNICFQNKFLANF
120
C  ::S::::::::::L:TV:NHMS::DDP::W::::::::::L::::::::::RW:L:A::ICF:N:::::

      130     140     150     160     170     180
1  FRTGKCIPITRGGGIYQENMNEALQRLKDG-----
140
2  FSLGQVLSTERFGVGPFQGSIDASIRLLSPDDTLDEWTPHSEVSSSLKKAYSPPIIRSK
180
C  F::G::::::::::R:G::::::::::A::RL:::::::::::::::::::::::::::::

      190     200     210     220     230     240
1  -SWLHTFPEGKVFQDDVPIR----RLKWGTASLIARSPVTPIVLPIIHRGFEEMMPENYN
195
2  PSWVHVYPEGFVLQLYPPFENSMRYFKWGITRMILEATKPPIVVPIFATGFEKIASEAVT
240
C  :SW:H:::PEG:V:Q::P::::::::::KWG:::::I::::::::::PIV:PI:::GFE::::E:::

      250     260     270     280     290     300
1  N--GRRPLVPLPNKHLKVVVGEPIDFVP-----
222
2  DSMFRQILPRNFGSEINVTIGDPLNDDLIDRYRKEWTHLVEKYYDPKNPNDSLDELKYGK
300
C  ::::R:::L::::::::::V::G:P:::D:::::::::::

      310     320     330     340     350     360
1  ----MMVETAVLDSRHVTPPLQEYKWPVLTSAQVLDATAQRHLYIALSEKIQSSLET LR
278
2  EAQDLRSRLAAELRAHVAEIRNEVRKLPRDPFRFKSPSWWKRFNTTEGKSDPDVKVIGEN
360
C  ::::::::::A:::::HV:::::EV::::::::::R::::::::::
    
```

Figure IV-2. Alignement des séquences protéiques At1g78690p et YPR140wp à l'aide du logiciel ClustalW.

Les séquences sont alignées grâce au logiciel ClustalW et mises en forme à l'aide du logiciel Edition of Sequences of Multiple Alignment (EDTALN) ([http:// bioinfo. hku. hk / services/analyseseq/cgi-bin/edtaln_in.pl](http://bioinfo.hku.hk/services/analyseseq/cgi-bin/edtaln_in.pl)). ":" si le caractère majoritaire a une représentation $\geq 40\%$.

1.2 Autres données sur les séquences nucléotidique et peptidique du gène At1g78690 et de sa protéine à partir de banques spécialisées.

Dans le but d'obtenir des données supplémentaires sur la protéine étudiée (présence de domaines transmembranaires, prédiction de sa localisation subcellulaire, localisation tissulaire, etc.) les séquences nucléotidique et peptidique ont été analysées à l'aide de différents logiciels.

1.2.1 Analyse de la séquence du gène At1g78690

Le gène At1g78690 dont la taille est de 1951pb (donnée du TAIR) est localisé sur le chromosome 1 du génome d'*Arabidopsis thaliana*. Il est composé de 5 exons, représentés figure IV-3 et sa séquence codante (CDS) est constituée de 855pb (cf. annexe 1).

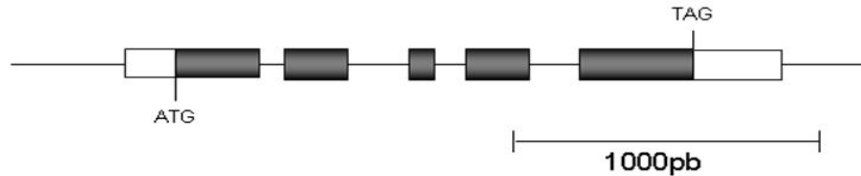


Figure IV-3. Structure du gène At1g78690. Les boîtes grisées représentent les exons et les parties blanches représentent les séquences non traduites en 3' et 5'.

1.2.2 Analyse de l'expression du gène At1g78690

L'analyse du taux de transcrits du gène d'intérêt dans les différents tissus et organes d'*Arabidopsis thaliana* a été effectuée dans un premier temps à l'aide des bases de données du site TAIR. D'après ces données, ce gène est exprimé de façon homogène chez *Arabidopsis thaliana* (Schmid *et al.*, 2005). Afin de confirmer ces données, une recherche de l'expression du transcrit de ce gène a été effectuée sur le site « Genevestigator » qui est une base de données regroupant les taux d'expression des gènes d'*Arabidopsis thaliana* obtenus par analyse de puces à ADN ([https:// www. genevestigator.com /gv / index. jsp](https://www.genevestigator.com/gv/index.jsp)) (Zimmermann *et al.*, 2004). Les résultats obtenus indiquent une faible expression de ce gène dans l'ensemble de la plante avec une expression modérée dans les fleurs.

1.2.3 Prédiction des domaines transmembranaires de la protéine At1g78690p

La protéine At1g78690p est constituée de 284 acides aminés, sa masse moléculaire est de 31742 Daltons et son point isoélectrique théorique a été déterminé à 8,8 (données du TAIR).

Les études menées par Frentzen *et al.* (1983) ont montré que les acyltransférases sont des protéines membranaires à l'exception des GPAT plastidiales des plantes supérieures. La séquence de la protéine candidate At1g78690p a été analysée par consultation de la base de données ARAMEMNON (Schwacke *et al.*, 2003) afin de vérifier si cette protéine possédait des segments transmembranaires. Cette base de données répertorie toutes les protéines membranaires putatives d'*Arabidopsis thaliana* et d'*Oriza sativa* ([http://.www.aramemnon.botanik.uni-koeln.de/](http://www.aramemnon.botanik.uni-koeln.de/)). Les résultats de plusieurs programmes de prédiction de segments transmembranaires y sont disponibles en libre accès. En parallèle, plusieurs programmes bioinformatiques ont été utilisés individuellement

comme : Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>), TMMOD (<http://liao.cis.udel.edu/website/servers/TMMOD/scripts/frame.php?p=submit>), TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), HMMTOP (www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html)). Les résultats sont synthétisés dans le tableau IV-1.

	Phobius	TMMOD	TMpred	TMHMM	HMMTOP
At1g78690p	2 segments TM	0 segment TM	2 segments TM 14-37 et 163-182	0 segment TM	0 segment TM

Tableau IV-1. Récapitulatif des résultats de prédictions des domaines transmembranaires obtenus via différents logiciels. TM, segment transmembranaire.

Les différents logiciels utilisés pour cette étude ne donnent pas tous les mêmes résultats. Le logiciel « Phobius prediction » indique la présence de deux segments transmembranaires putatifs mais avec une faible probabilité d'existence. Il en est de même du logiciel « TMpred » qui prédit la présence de deux segments transmembranaires entre le 14^{ème} et le 37^{ème} et le 163^{ème} et le 182^{ème} acide aminé. Les autres logiciels utilisés ne prédisent aucun segment transmembranaire à partir de cette séquence protéique.

Le profil d'hydrophobicité de la protéine At1g78690p a été obtenu à l'aide du logiciel ProtScale (<http://ca.expasy.org/tools/protscale.html>) selon la méthode de Kyte et Doolittle (Kyte et Doolittle, 1982) avec une fenêtre de 19 acides aminés. Ce profil a permis de mettre en évidence la présence de deux segments hydrophobes situés entre le 10^{ème} et 40^{ème} acide aminé pour l'un et entre le 170^{ème} et 190^{ème} acide aminé pour l'autre (figure IV-4). Ces régions hydrophobes observées correspondent aux segments transmembranaires prédits par les logiciels « Phobius » et « TMpred » (14-37 ; 169-183).

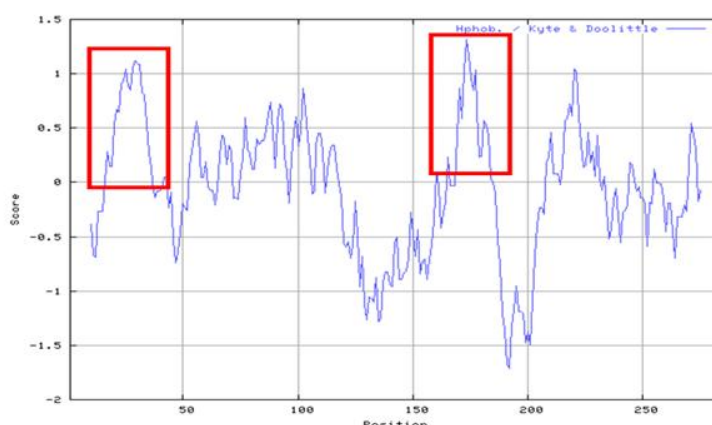


Figure IV-4. Profil d'hydrophobicité de la protéine At1g78690p. Le profil d'hydrophobicité est réalisé à l'aide du logiciel ProtScale (<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>) en utilisant l'algorithme de Kyte et Doolittle (1982) avec une fenêtre de 19 acides aminés. Sur l'axe vertical, les valeurs positives représentent le caractère hydrophobe de chaque résidu et les valeurs négatives le caractère hydrophile.

Par ailleurs, la présence de sites de myristoylation, de prénylation et d'ancre GPI, pouvant permettre l'ancrage des protéines à la membrane, a été recherchée à l'aide de logiciels de prédiction de modifications post-traductionnelles (NMT, <http://mendel.imp.ac.at/myristate/> / SUPLPredictor.htm, PrePS, <http://mendel.imp.ac.at/sat/PrePS/index.html>, Big-PI http://mendel.imp.ac.at/gpi/gpi_server.html). D'après ces logiciels, la séquence At1g78690p ne présente aucun de ces sites.

D'après les prédictions faites sur la présence des segments transmembranaires, et la localisation des motifs caractéristiques des acyltransférases, un modèle peut être proposé pour représenter la protéine At1g78690p. D'après « TM pred », « Phobius » et le profil d'hydrophobicité de la protéine d'intérêt, deux segments transmembranaires ont été prédits le premier entre le 14^{ème} et le 37^{ème} acide aminé (AA) et le second entre le 169^{ème} et le 183^{ème} AA de la protéine. D'après ces données, le motif 1 des « acyltransférases » (localisé ici entre le 62-77^{ème} AA) serait alors situé entre les deux segments transmembranaires ce qui a pour conséquence de le placer d'un côté de la membrane, tandis que les deux autres motifs « acyltransférases » (motif 3 et 4) seraient situés de l'autre côté (figure IV-5). Une telle configuration a déjà été proposée pour la G3P acyltransférase humaine (Yamashita *et al.*, 2007).

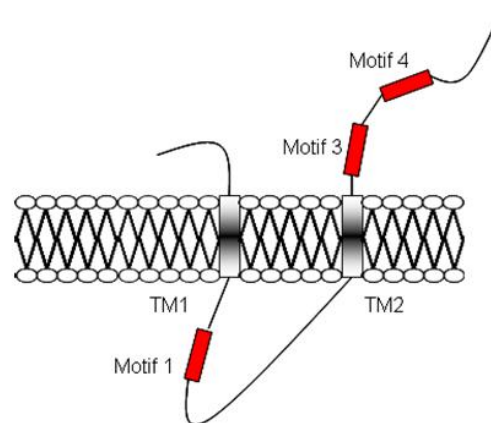


Figure IV-5. Proposition de l'incorporation de la protéine At1g78690p au sein d'une membrane.
TM1 ou 2 : segment transmembranaire 1,2.

1.2.4 Analyse de la localisation potentielle de la protéine At1g78690p

Les acyltransférases n'ont pas toutes la même localisation subcellulaire. En effet certaines ont été décrites dans les particules lipidiques et dans le RE (Athenstaedt et Daum, 1997), d'autres dans les mitochondries (Testet *et al.*, 2005) ou dans les chloroplastes par exemple (Bessoule *et al.*, 1995 ; Bourgis *et al.*, 1999). Une recherche de signaux d'adressage dans la séquence de la protéine d'intérêt a donc été effectuée afin d'identifier une localisation subcellulaire théorique. Pour ce faire, différents logiciels de prédiction ont été utilisés comme PSORT II (<http://psort.i.ms.u-tokyo.ac.jp/form2.html>), Target P (<http://>

[www.cbs.dtu.dk/ services / TargetP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/)), Mitoprot ([http:// ihg2. helmholtz-muenchen. de / ihg / mitoprot. html](http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html)) et Predotar ([http:// urgi.versailles.inra.fr / predotar / predotar.html](http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html)).

D'après les données bioinformatiques, cette protéine ne serait pas localisée au niveau des mitochondries (MITOPSORT II), ni au niveau des noyaux des cellules (PSORTII) (tableau IV-2). En contradiction avec la présence des deux segments transmembranaires identifiés lors de l'analyse du profil d'hydrophobicité de la protéine, la localisation la plus probable donnée par l'un des logiciels (PSORTII) est une localisation cytoplasmique. En revanche, le logiciel « Phobius prédiction » propose une localisation non cytoplasmique de la protéine sans toutefois spécifier une localisation subcellulaire précise. Ainsi l'ensemble des résultats obtenus à partir des différents logiciels ne permet pas de proposer une localisation subcellulaire probable de la protéine At1g78690p.

	PSORT II	Target P	MITOPROT	Predotar
Localisation d'At1g78690p	65,2% Cyto 21,7% nuclear 13,0% mito	Voie sécrétoire	Non mitochondriale	Pas de prediction

Tableau IV-2. Récapitulatif des résultats de la localisation subcellulaire de la protéine At1g78690p par les différents programmes de prédiction.

Les localisations subcellulaires de la protéine d'intérêt sont prédites à l'aide des logiciels PSORT II ([http://psort .ims. u-tokyo. ac.jp /form2.html](http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html)), TargetP ([http://www. cbs.dtu.dk / services/ TargetP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/)), MITOPROT ([http:// ihg2. helmholtz-muenchen. de/ ihg / mitoprot. html](http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html)) et Predotar ([http://urgi. versailles.inra.fr/ predotar / predotar. html](http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html)). Cyto, cytoplasme ; Nuclear, noyau ; Mito, mitochondrie.

En résumé, d'après les données fournies par les banques spécialisées, la protéine At1g78690p semble réunir toutes les caractéristiques des acyltransférases à domaine « plsC ». En effet, cette protéine possède des domaines conservés des acyltransférases (bloc 1, 3 et 4) et des domaines transmembranaires putatifs. L'analyse de cette séquence protéique n'a cependant pas permis d'identifier sa localisation subcellulaire. Les résultats obtenus *via* le site TAIR et Genvestigator semblent suggérer une localisation homogène des transcrits pour le gène d'intérêt.

2. Mise en évidence d'une activité acyltransférase de la protéine At1g78690p chez *E.coli*

Dans la première partie de ce travail, une nouvelle protéine, At1g78690p, susceptible de correspondre à une acyltransférase a été sélectionnée par homologie de séquence avec la protéine YPR140wp de *Saccharomyces cerevisiae*. La suite de l'étude a consisté à valider expérimentalement les prédictions réalisées par bioinformatique en recherchant notamment à caractériser l'activité (acyltransférase ?) de cette protéine.

La protéine YPR140wp catalyse la réaction d'acylation d'un résidu lysophosphatidylcholine (LPC) en phosphatidylcholine (PC) par acylation de la position *sn2* via un donneur d'acyle (Testet *et al.*, 2005). Etant donnée l'homologie de séquence de la protéine At1g78690p avec cette protéine, il a été d'abord examiné si cette protéine catalysait cette même réaction (figure IV-6).

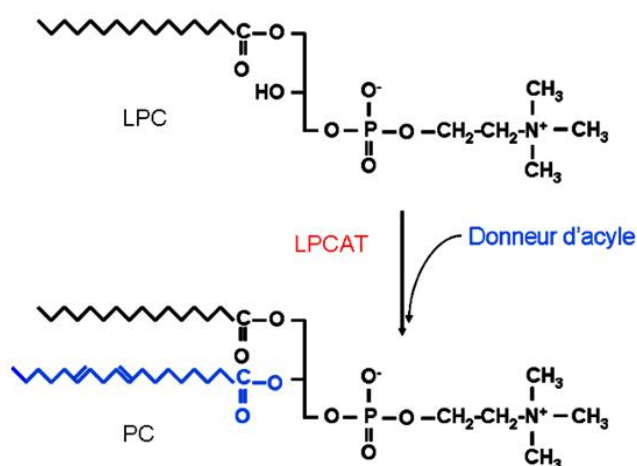


Figure IV-6. Réaction de synthèse de phosphatidylcholine (PC) à partir de lysophosphatidylcholine (LPC) catalysée par une lysophosphatidylcholine-acyltransférase (LPCAT).

Le gène At1g78690 a donc été cloné dans le vecteur d'expression pET-15b. Les plasmides recombinants ont ensuite été transférés dans la souche *E. coli* C41 (DE3). Par ajout d'IPTG, les protéines ont ensuite été exprimées dans la souche transformée. Chaque essai a été réalisé en parallèle sur des fractions membranaires de souche *E. coli* C41(DE3) contenant le plasmide pET-15b vide de façon à vérifier que la réaction étudiée ne soit pas catalysée par une protéine codée par un gène bactérien.

2.1 Mesure *in vitro* de l'activité Lyso-PC acyltransférase de la protéine At1g78690p à partir d'extraits de membranes d'*E. coli*

Il a été vérifié par électrophorèse SDS-PAGE que la protéine d'intérêt était présente dans les membranes des bactéries *E. coli* C41 (DE3) transformées par le plasmide pET-15b::At1g78690. Il apparaît qu'une protéine supplémentaire est obtenue dans les extraits de membranes provenant de bactéries transformées par le plasmide pET-15b::At1g78690 (figure IV-7 ; pistes 5-8) en comparaison avec le contrôle (pistes 1-4). Cette protéine supplémentaire a une masse moléculaire d'environ 30KDa ce qui correspond à la taille attendue de la protéine At1g78690p (32KDa).

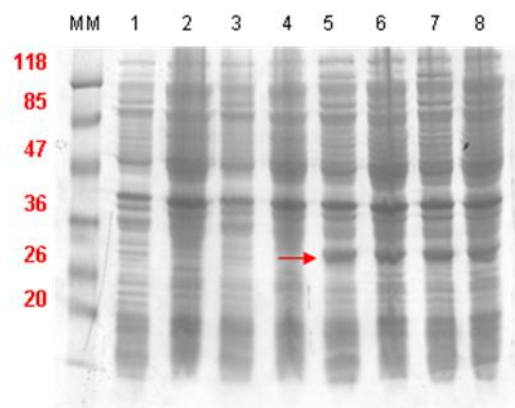


Figure IV-7. Gel SDS-PAGE des protéines totales d'*E. coli* C41(DE3) transformées par le plasmides pET-15b::At1g78690 ou pET-15b vide, après induction à l'IPTG.

Cent μ l d'extraits de fractions membranaires sont centrifugés, repris dans 10 μ l de tampon de charge et déposés sur un gel de polyacrylamide à 12%. Après migration, le gel est coloré au bleu de coomassie. Les pistes 1 à 4 correspondent aux extraits des fractions membranaires des bactéries *E. coli* C41(DE3) contenant le plasmide pET-15b vide induites 3h avec de l'IPTG (1mM) et les pistes 5 à 8 correspondent aux extraits des fractions membranaires de bactéries *E. coli* contenant le plasmide pET-15b::At1g78690 induites 3h avec de l'IPTG (1mM) ; MM, marqueur de masse moléculaire.

2.1.1 Tests enzymatiques réalisés à partir de [14 C]-LPC

Les premiers tests enzymatiques ont été réalisés sur des extraits de membranes de bactéries *E. coli* exprimant ou non la protéine At1g78690p en présence de 0,5nmol d' [14 C]-lysophosphatidylcholine ([14 C]-LPC) plus ou moins 5nmol d'oléoyl-CoA, à 30°C pendant 30 minutes. Après extraction des lipides, les phospholipides ont été séparés par CCM et les produits radioactifs formés ont été analysés à l'aide d'un PhosphorImager.

Aucune synthèse de PC n'a été mesurée avec des extraits de membranes ne contenant pas la protéine d'intérêt (figure IV-8). En revanche, lors des essais avec des membranes contenant la protéine d'intérêt, une synthèse identique de PC a été mesurée en présence ou en absence d'oléoyl-CoA (figure IV-8).

Ainsi, d'après ces premières expériences, At1g78690p pourrait être, tout comme YPR140wp, une lyso-PC acyltransférase acyl-CoA indépendante.

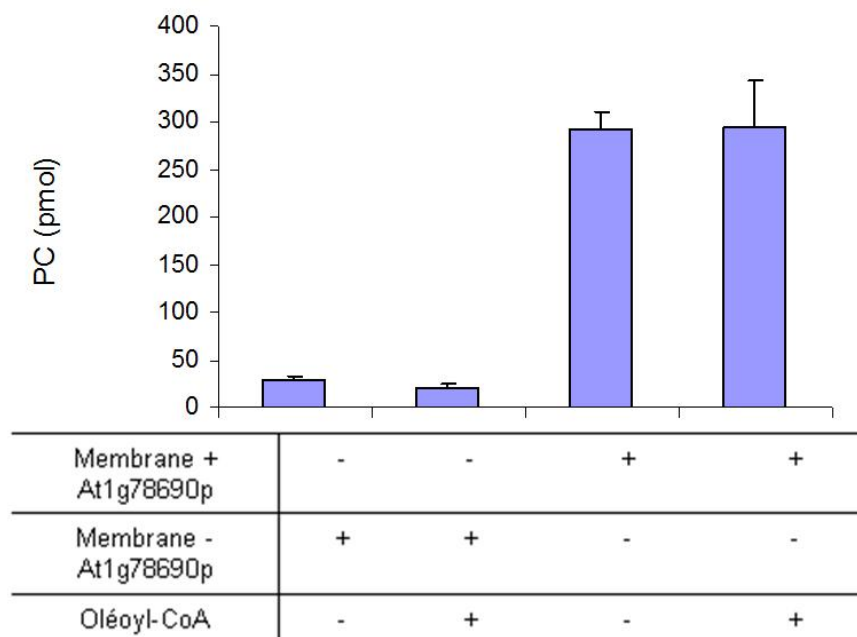


Figure IV-8. Etude de l'activité de la protéine At1g78690p en fonction de la présence ou non d'oléoyl-CoA.

Les essais ont été réalisés dans un volume réactionnel de 100µl contenant du tampon Tris-HCl (50mM ; pH8), avec agitation 120rpm pendant 30 minutes de temps réactionnel en présence de 10µg de protéines 0,5nmol de [14 C]-LPC +/- 5nmol d'oléoyl-CoA. Les lipides sont extraits et séparés par CCM à l'aide d'un système de solvants polaires « Vitiello » (cf. « Matériels et Méthodes »). Les résultats représentent la valeur moyenne de 3 analyses par essai.

2.2 Etude de la spécificité de la protéine At1g78690p en fonction de différents substrats lysophospholipidiques

Nous avons ensuite cherché à déterminer le spécificité de l'enzyme envers les différents lysolipides. Etant donné qu'hormis la [14 C]-LPC, aucun autre lysophospholipide radiomarké n'est disponible dans le commerce, une stratégie de test, dit de dilution isotopique, a été envisagée pour déterminer la spécificité de l'enzyme envers le substrat accepteur d'acyle.

2.2.1 Détermination des conditions de saturation de la protéine At1g78690p pour le substrat [14 C]-LPC

Pour réaliser ce test de dilution isotopique, il est nécessaire de déterminer la quantité de substrat [14 C]-LPC suffisante pour saturer une quantité donnée de protéines At1g78690p.

Pour cela des expériences préliminaires menées avec 0,5nmol de [14 C]-LPC dans 100µl de tampon Tris HCl 50mM, pH8 (agitation 120rpm) ont montré que la quantité de [14 C]-

PC formée était proportionnelle à la quantité de protéines entre 0 et 20 μ g (30 minutes d'incubation) et linéaire en fonction du temps d'incubation entre 0 et 30min (en utilisant 10 μ g de protéines). Nous avons cherché alors à déterminer les conditions de saturation en substrat ($[^{14}\text{C}]$ -LPC) de l'enzyme. Pour cela des incubations pendant 10min en présence de 10 μ g de protéines, à 30°C, sous agitation (120rpm), avec une concentration de substrat $[^{14}\text{C}]$ -LPC variant de 0 à 40 μ M ont été réalisées. Les résultats (figure IV-9) montrent que la vitesse maximale est atteinte dès 15-20 μ M en LPC, et la représentation en double inverse ($1/V=f(1/[S])$), permet de calculer un k_{Mapp} de l'ordre de 8 μ M (figure IV-9B).

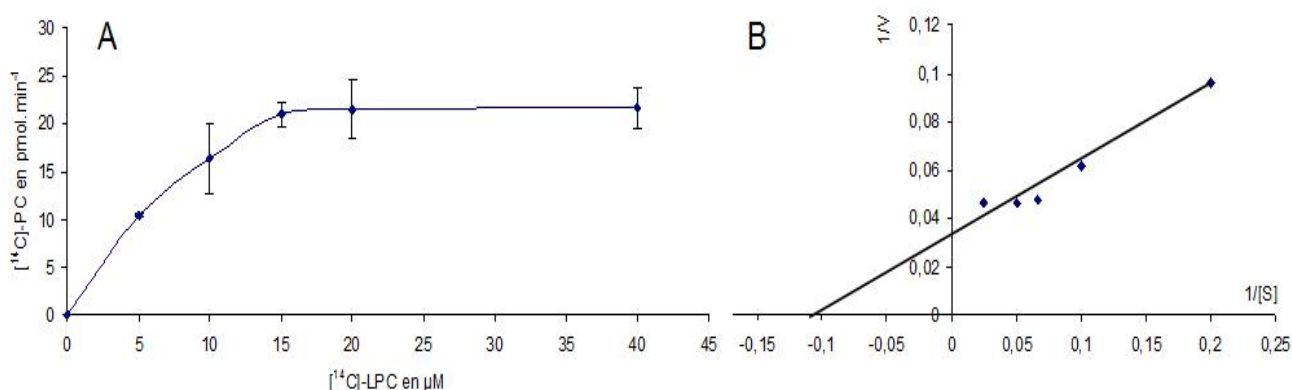


Figure IV-9. Détermination des conditions de saturation de l'enzyme pour le substrat $[^{14}\text{C}]$ -LPC. A, $V=f([S])$; B, $1/V=f(1/[S])$. Les essais ont été réalisés dans un volume réactionnel de 100 μ l contenant du tampon Tris-HCl (50mM; pH8), sous agitation (120rpm) pendant 10 minutes en présence de 10 μ g de protéines et d'une quantité de substrat ($[^{14}\text{C}]$ -LPC) variant de 0 à 4nmol. Les lipides ont été extraits et séparés par CCM à l'aide d'un système de solvants polaires « Vitiello » (cf. « Matériels et Méthodes »). Les résultats représentent la valeur moyenne de 3 essais.

2.2.2 Test de dilution isotopique

Le principe de ce test est de réaliser une réaction enzymatique donnée en présence d'une quantité saturante d'un substrat radiomarqué dilué avec un autre substrat non radiomarqué (froid). Dans le cas présent, il s'agit d'une dilution de 2nmol de $[^{14}\text{C}]$ -LPC avec 2nmol d'un autre lysophospholipide froid (LPL). Si l'enzyme est plus spécifique envers cet autre lysolipide, la quantité de $[^{14}\text{C}]$ -PC mesurée sera inférieure à la quantité de $[^{14}\text{C}]$ -PC obtenue en présence de $[^{14}\text{C}]$ -LPC et de LPC froid. En revanche, si l'enzyme n'est pas spécifique du substrat LPL froid alors la quantité de $[^{14}\text{C}]$ -PC synthétisée sera supérieure à la quantité de $[^{14}\text{C}]$ -PC formée lors des essais en présence de $[^{14}\text{C}]$ -LPC/LPC. Enfin si l'enzyme a la même spécificité pour le substrat $[^{14}\text{C}]$ -LPC que le substrat LPL alors la quantité de $[^{14}\text{C}]$ -PC mesurée sera identique à la quantité de $[^{14}\text{C}]$ -PC mesurée lors des essais $[^{14}\text{C}]$ -LPC/LPC.

Les essais ont été réalisés à 30°C pendant 10 min dans un volume réactionnel de 100 μ l en présence de 10 μ g de protéines membranaires et de 4nmol de substrat lysophospholipidique (5 fois le K_m pour la LPC), dont 2nmol de $[^{14}\text{C}]$ -LPC et de 2nmol d'un

autre résidu lysophospholipide non radiomarké (LPL). Après extraction, les phospholipides ont été séparés par CCM et la radioactivité a été mesurée à l'aide d'un PhosphorImager. La quantité de [^{14}C]-PC synthétisée en présence de différents substrats LPL est inférieure à la quantité de [^{14}C]-PC formée à partir du mélange [^{14}C]-LPC/LPC. Ainsi cette enzyme ne semble pas spécifique pour le substrat LPC, et le LPG semble être le substrat préférentiel de cette enzyme (figure IV-10).

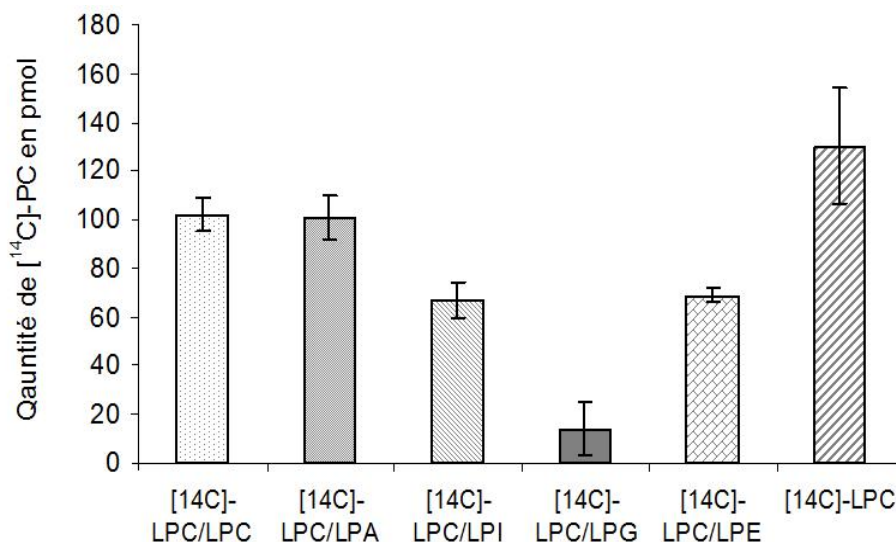


Figure IV-10. Quantité de [^{14}C]-PC synthétisée en utilisant des fractions membranaires d'*E.coli* C41(DE3) contenant le plasmide pET-15b::At1g78690 en fonction du mélange de lysophospholipides utilisé lors de la réaction. Les essais ont été réalisés dans un volume réactionnel de 100 μl contenant du tampon Tris-HCl (50mM ; pH8), 10 μg de protéines membranaires et 4nmol de substrat lysophospholipide dont 2nmol de [^{14}C]-LPC et 2nmol d'un autre substrat lysophospholipide non radioactif (LPL). Essai 1, [^{14}C]-LPC + LPC froid ; essai 2, [^{14}C]-LPC + LPA froid ; essai 3, [^{14}C]-LPC + LPI froid ; essai 4, [^{14}C]-LPC + LPG froid ; essai 5, [^{14}C]-LPC + LPE froid, essai 6, 2nmol de [^{14}C]-LPC. Les mélanges sont incubés à 30 $^{\circ}\text{C}$ pendant 10 minutes sous agitation (120rpm). Les lipides ont été extraits avec du chloroforme/méthanol (2:1, v/v), et séparés par CCM à l'aide d'un système de solvants polaires « Vitiello » (cf. « Matériels et Méthodes »). Les résultats représentent la valeur moyenne de 3 essais. LPA, acide lysophosphatidique ; LPC, lysophosphatidylcholine ; LPE, lysophosphatidyléthanolamine ; LPG, lysophosphatidylglycérol ; LPI, lysophosphatidylinositol.

Nous avons voulu ensuite étudier l'activité lyso-PG acyltransférase (LPG-AT) de la protéine. Des tests enzymatiques utilisant le [^{14}C]-LPG comme substrat ont donc été planifiés. Cependant ce substrat radiomarké n'existant pas dans le commerce, une production de LPG radiomarké a été entreprise au laboratoire.

2.3 Etude *in vivo* de la composition lipidique des souches d'*E. coli* transformées ou non avec le gène d'intérêt

Nous avons envisagé d'obtenir du [^{14}C]-LPG en 5 grandes étapes :

- Une culture de bactéries *E.coli* en milieu liquide en présence d'acétate radioactif afin de marquer l'ensemble des lipides bactériens dont le PG.
- Une extraction des lipides totaux suivie de leur séparation par CCM.

- Une extraction du [^{14}C]-PG suivie d'un traitement à la phospholipase A_2
- Une extraction des produits d'hydrolyse suivie d'une purification du [^{14}C]-LPG par CCM.
- Enfin une extraction de la [^{14}C]-LPG.

Les souches de bactéries utilisées pour synthétiser des lipides radiomarqués *in vivo* ont été la souche d'*E.coli* C41(DE3) transformée par le plasmide pET-15b::At1g78690 ou par le plasmide pET-15b vide. Après culture des bactéries en présence d' [^{14}C]-acétate, les lipides bactériens ont été extraits puis séparés par CCM et leur radioactivité a été visualisée et quantifiée à l'aide d'un PhosphorImager (figure IV-11).

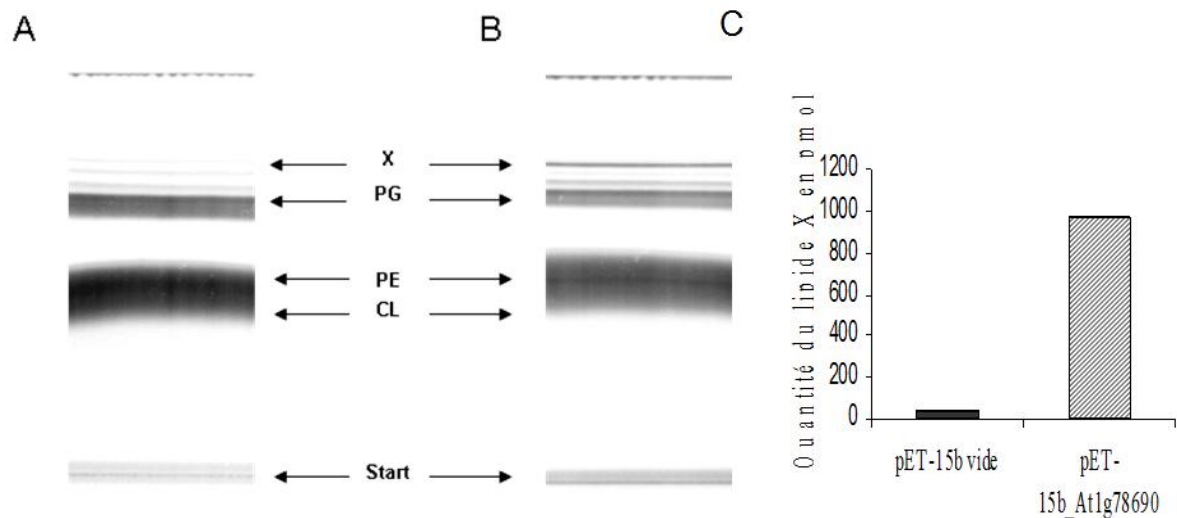


Figure IV-11. Effet de l'expression hétérologue de la protéine At1g78690p sur la composition lipidique des bactéries *E. coli*. 100ml de bactéries *E.coli* C41(DE3) transformées par le plasmide pET-15b vide ou pET-15b::At1g78690 ont été cultivés sur milieu LB + ampicilline ($0,1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) en présence de $0,04\text{mCi}$ d' [^{14}C]-acétate. La synthèse d'At1g78690p a été induite pendant 3h à 30°C à l'aide d'IPTG (1mM) Les lipides ont été extraits comme décrit dans la partie « Matériels et Méthodes », déposés sur plaque CCM et séparés à l'aide d'un système de solvants « pyridine ». Visualisation des composés radioactifs après CCM des lipides totaux d' *E. coli* transformées par : A, le plasmide p-ET15b vide ; B, par le plasmide pET-15b::At1g78690. C, Mesure de la radioactivité associée au lipide X synthétisé *in vivo* chez *E. coli* C41(DE3) contenant le plasmide pET-15b vide ou pET-15b::At1g78690.

Les lipides majoritaires des bactéries *E. coli* sont la PE, le PG et les CL qui représentent à eux trois 70 à 90% des lipides totaux (De Siervo, 1969). Les 10% restant sont entre autres le PA et la N-acylphosphatidyléthanolamine (NAPE) mise en évidence chez *E.coli* en 2002 (Helmy *et al.*, 2002). L'analyse de la radioactivité associée aux lipides des 2 souches utilisées montre que la radioactivité s'est essentiellement incorporée (de manière attendue) dans les lipides majoritaires d'*E. coli* : PE, PG et CL. Mais cette analyse met aussi -et surtout- en évidence le fait que par rapport à la souche contrôle (A), la souche transformée par le plasmide contenant le gène d'intérêt (B) synthétise un lipide radioactif supplémentaire (lipide « X », Figure IV-11. B). Ce lipide ne correspondant pas au PG, ces

résultats ont grandement remis en cause l'hypothèse d'une activité LPGAT pour At1g78690p.

Afin de tenter de déterminer l'activité associée à At1g78690p, nous avons alors cherché à identifier le lipide supplémentaire synthétisé par les bactéries *E.coli* exprimant cette protéine. Nous sommes partie de la double constatation que d'une part, le lipide X était très fortement synthétisé par les bactéries transformées puisqu'il était visualisable non seulement après analyse de la radioactivité incorporée (Figure IV-11. B), mais aussi « en masse » après une révélation à la primuline (non montré), et d'autre part que la protéine At1g78690p était *a priori* une acyltransférase. L'idée a donc émergé que le lipide X pouvait résulter de l'acylation d'un lipide (le plus probablement) abondant chez *E. Coli* : à savoir PG, PE ou CL. Or à notre connaissance aucune acylation de CL n'était décrite dans la littérature, ni aucune acylation de phosphatidylglycérol chez les plantes. En revanche l'existence de molécules de PE acylées sur la fonction amine (NAPE ; cf. figure IV-12) était bien documentée tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes, et notamment chez *A. thaliana* (Bomstein *et al.*, 1965 ; Chapman *et al.*, 1993, 1995).

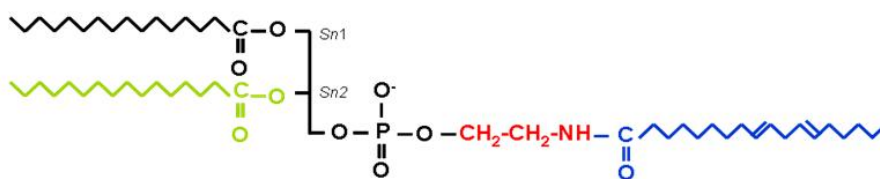


Figure IV-12. Molécule de N-acylphosphatidyléthanolamine (NAPE). *sn1* : substitution nucléophile 1 ; *sn2* : substitution nucléophile 2

Il a donc été envisagé que la protéine d'*Arabidopsis* At1g78690p puisse catalyser l'acylation de PE, permettant ainsi la synthèse de NAPE. Le R_f de migration de ce lipide X en solvant « Vitiello » n'étant par ailleurs pas incompatible avec le R_f de migration de la NAPE (Testet *et al.*, 2002), nous avons cherché à déterminer si le lipide X était bien de la NAPE.

En résumé, les tests d'activités réalisés avec des membranes contenant la protéine d'intérêt en présence de [14 C]-LPC ont montré une synthèse possible de [14 C]-PC. Cependant, des tests de dilution isotopique ont montré que cette protéine n'était pas spécifique envers cet accepteur d'acyle. La LPG semblait à ce stade être le meilleur substrat pour cette enzyme. Cependant l'analyse des lipides synthétisés *in vivo* par les bactéries transformées avec le gène d'intérêt nous a conduit à émettre l'hypothèse que la protéine At1g78690p catalysait la synthèse de NAPE. Des expériences complémentaires ont donc été planifiées pour confirmer (ou infirmer) cette assertion.

2.4 Identification du lipide X synthétisé par la protéine At1g78690p chez *E. coli*

Plusieurs approches ont été suivies afin de déterminer si le lipide synthétisé *in vivo* par les bactéries exprimant la protéine At1g78690p correspondait à de la NAPE.

2.4.1 Par chromatographie sur couche mince (CCM)

2.4.1.1 Monodimensionnelles

Le spot correspondant au lipide X (figure IV-11) a été gratté des plaques CCM obtenues précédemment, puis extrait de la silice (cf. « Matériels et Méthodes ») afin d'être chromatographié à nouveau avec différents solvants. Trois systèmes de migration ont été utilisés afin d'identifier la nature du lipide X (figure IV-13) :

- Un système de solvants polaires « Vitiello » : chloroforme /méthanol /méthyle acétate /N-propanol /KCl aqueux 0,25% (10:4:10:10:3,6 ; v/v/v/v/v).
- Un système de solvants à base de pyridine : chloroforme /pyridine /acide formique (25:15:3,5 ; v/v/v).
- Un système de solvants à base d'ammoniaque : chloroforme/ méthanol/ hydroxyde d'ammonium (80:20:2 ; v/v/v).

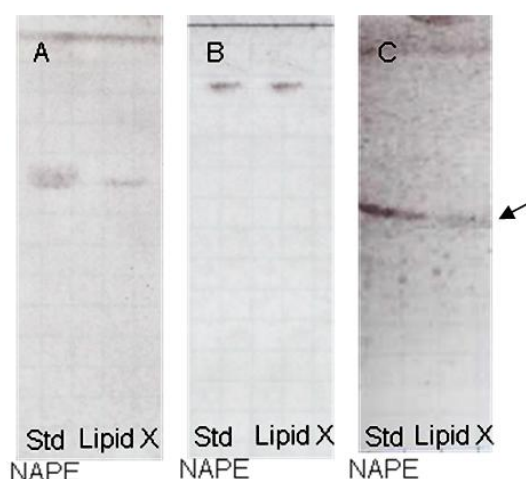


Figure IV-13. Migration du lipide X par CCM en fonction de différents systèmes de solvants.

A, CCM avec utilisation d'un système de solvants polaires « Vitiello » chloroforme/méthanol/méthyl-acétate/N-propanol/eau KCl 0,25% (10:4:10:10:3,6 ; v/v/v/v/v). B, CCM avec utilisation d'un système de solvants à base de pyridine : chloroforme/pyridine/acide formique (25:15:3,5 ; v/v/v). C, CCM avec utilisation d'un système de solvants à base d'ammoniaque : chloroforme/méthanol/NH₃ 14% (40:10:1 ; v/v/v). Les plaques ont été révélées par immersion dans une solution de primuline 0,01% (p/v) dans une solution acétone/eau (8:2, v/v). Les lipides ont été ensuite visualisés par exposition des plaques à 366nm à l'aide d'un ImageQuant. STD NAPE : standard de N-acylphosphatidyléthanolamine.

Pour chaque migration, un standard commercial de NAPE (Sigma Aldrich) a été utilisé afin de comparer son R_f avec celui du lipide X. Les résultats montrent que quelque soit le système de solvants employé, le lipide X a le même R_f que celui du standard de NAPE, confirmant l'hypothèse d'une synthèse de NAPE chez les bactéries *E. coli* exprimant la protéine At1g78690p.

2.4.1.2 Bidimensionnelles

Afin de conforter cette identification, des CCM bidimensionnelles d'extraits de lipides totaux de bactéries transformées par le gène d'intérêt ou par le plasmide pET-15b vide ainsi que d'un standard de NAPE ont été réalisées.

La première migration a été effectuée dans un système de solvants polaires « Vitiello ». Après séchage de la plaque, une deuxième migration dans un système de solvants à base de pyridine a été réalisée en orientant la plaque à 90° par rapport à la première migration.

Les résultats obtenus (figure IV-14) montrent un profil lipidique quasi identique entre les bactéries *E. coli* transformées par le plasmide vide ou contenant le gène At1g78690. On retrouve dans leur ordre d'abondance la présence de PE, PG et CL. Il est cependant possible d'observer la présence d'un lipide supplémentaire dans le cas des bactéries exprimant la protéine d'intérêt de la même façon que lors de la chromatographie monodimensionnelle. Ce lipide a des coordonnées de migration identiques à celles d'un standard commercial de NAPE (i.e. $R_{f,x,y} = 0,63 ; 0,69$; figure IV-14).

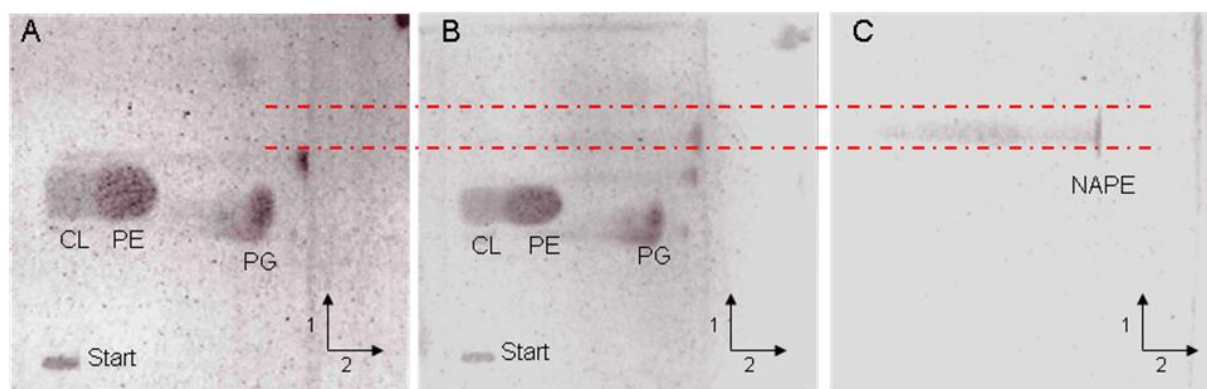


Figure IV-14. Analyse de la composition lipidique par CCM bidimensionnelle des bactéries C41(DE3) transformées par le plasmide pET-15b vide ou pET-15b::At1g78690.

A, extrait lipidique des bactéries *E. coli* transformées par le plasmide vide après 3 heures d'incubation à 30°C avec de l'IPTG (1mM) ; B extrait lipidique des bactéries *E. coli* contenant le plasmide pET-15b::At1g78690 après 3 heures d'incubation avec de l'IPTG (1mM) ; C, standard de NAPE. Sens 1 réalisé avec un système de solvants « Vitiello » (cf. « Matériels et Méthodes »). Sens 2 réalisé avec un système de solvants à base de pyridine (cf. « Matériels et Méthodes »). Les plaques ont été révélées par immersion dans une solution de primuline 0,01% (p/v) dans une solution acétone/eau (8:2, v/v). Les lipides ont été ensuite visualisés par exposition des plaques à 366nm à l'aide d'un ImageQuant. CL, cardiolipide ; NAPE, N-acylphosphatidyléthanolamine ; PE, phosphatidyléthanolamine ; PG, phosphatidylglycérol.

Quel que soit le système de solvants utilisé pour les CCM mono ou bidimensionnelles, le lipide X migre donc systématiquement de la même façon qu'un standard commercial de NAPE. Ainsi il est très probable au vu de ces résultats que le lipide X soit de la NAPE, et donc que la protéine At1g7890p catalyse la N-acylation de PE quand elle est exprimée chez *E. coli*. D'autres expériences complémentaires ont cependant été réalisées pour confirmer cette hypothèse.

2.4.2 Par analyse biochimique : test à la phospholipase D (PLD)

In vivo, les NAPE sont des substrats des PLD. Ces enzymes clivent ces lipides au niveau de la liaison phosphodiester formant d'une part du PA et d'autre part de la NAE (figure IV-15) (cf. « Donnée Bibliographiques »).



Figure IV-15. Réaction de dégradation des NAPE catalysée par une PLD.

NAE, N-acyléthanolamine ; NAPE, N-acylphosphatidyléthanolamine ; PA, Acide phosphatidique ; PLD, Phospholipase D.

Le lipide X a été incubé avec une PLD de *Streptomyces chromofuscus* (Sigma, St Louis, MO) dans un système biphasique. Après 3 heures, les produits formés ont été extraits et séparés par CCM.

Les résultats (figure IV-16) montrent qu'après incubation du lipide X avec la PLD de *Streptomyces chromofuscus*, il est possible d'observer la présence de deux composés (piste 4) dont les R_f de migration sont identiques à ceux d'un standard commercial de PA (non montré) et d'un standard commercial de NAE (piste 1). Il a été vérifié que les conditions d'incubation du test ne pouvaient pas induire une dégradation chimique de l'échantillon (piste 3). Ainsi la synthèse de PA et de NAE résulte de l'action de la PLD sur le lipide X.

Ces nouvelles données viennent confirmer que la protéine At1g78690p est responsable de la synthèse de NAPE chez les bactéries *E.coli* C41(DE3) transformées par le plasmide pET-15b::At1g78690. Des analyses par spectrométrie de masse (ESI-MS/MS) ont

ensuite été réalisées sur des extraits totaux de bactéries *E.coli* transformées par le plasmide pET-15b::At1g78690 ou par le plasmide vide pour compléter cette identification (composition des acides gras en position *sn1*, *sn2* et amine).

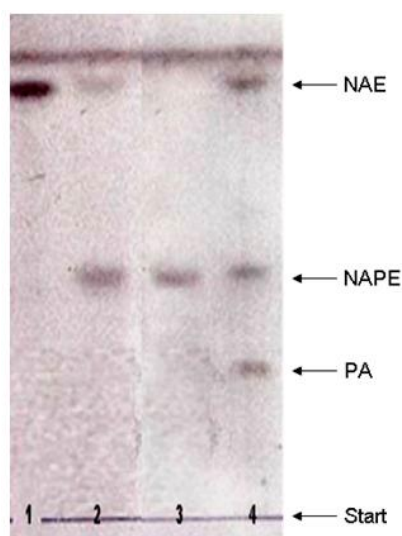


Figure IV-16. Analyse par CCM des produits d'hydrolyse du lipide X après traitement avec une phospholipase D (PLD) de *Streptomyces chromofuscus*.

Les essais ont été réalisés à 32°C, pendant 3 heures sous agitation (120rpm) (cf. « Matériels et Méthodes »). Les lipides ont été séparés par CCM à l'aide d'un système de solvants polaires (Vitiello). Piste 1, STD de NAE ; piste 2, STD de NAPE ; piste 3, lipide X incubé sans PLD ; piste 4, lipide X incubé en présence de PLD. NAE, N-acyléthanolamine ; NAPE, N-acylphosphatidyléthanolamine ; PA, Acide phosphatidique.

2.4.3 Par spectrométrie de masse : ESI-MS/MS

Les lipides totaux ont été extraits comme décrit dans la partie « Matériels et Méthodes » à partir de 50ml de culture des différents clones bactériens, puis analysés par ESI-MS/MS à l'aide d'un spectromètre de masse LCQ ADVANTAGE, Thermo Fisher®. Les échantillons ont été injectés directement dans la source ESI où les différents composés subissent un processus de nébulisation avant d'entrer dans une trappe ionique. Ces analyses ont été réalisées dans le laboratoire de « Spectrométrie de masse des macromolécules biologiques », plateforme de spectrométrie de masse de l'IECB, dirigé par le professeur Jean-Marie Schmitter (Université de Bordeaux UMR 5248 CNRS-UBX1-ENITAB).

L'analyse des profils « full scan » obtenus a permis d'identifier la présence de pics identiques entre les profils des bactéries exprimant la protéine d'intérêt ou non (figure IV-17). De plus, des pics supplémentaires correspondant à des ions de masses comprises entre 900 et 1000 m/z ont été observés dans les spectres correspondant aux bactéries transformées par le gène At1g78690 (figure IV-17). Des fragmentations ont été alors réalisées par CID sur ces ions afin d'obtenir leurs spectres MS/MS.

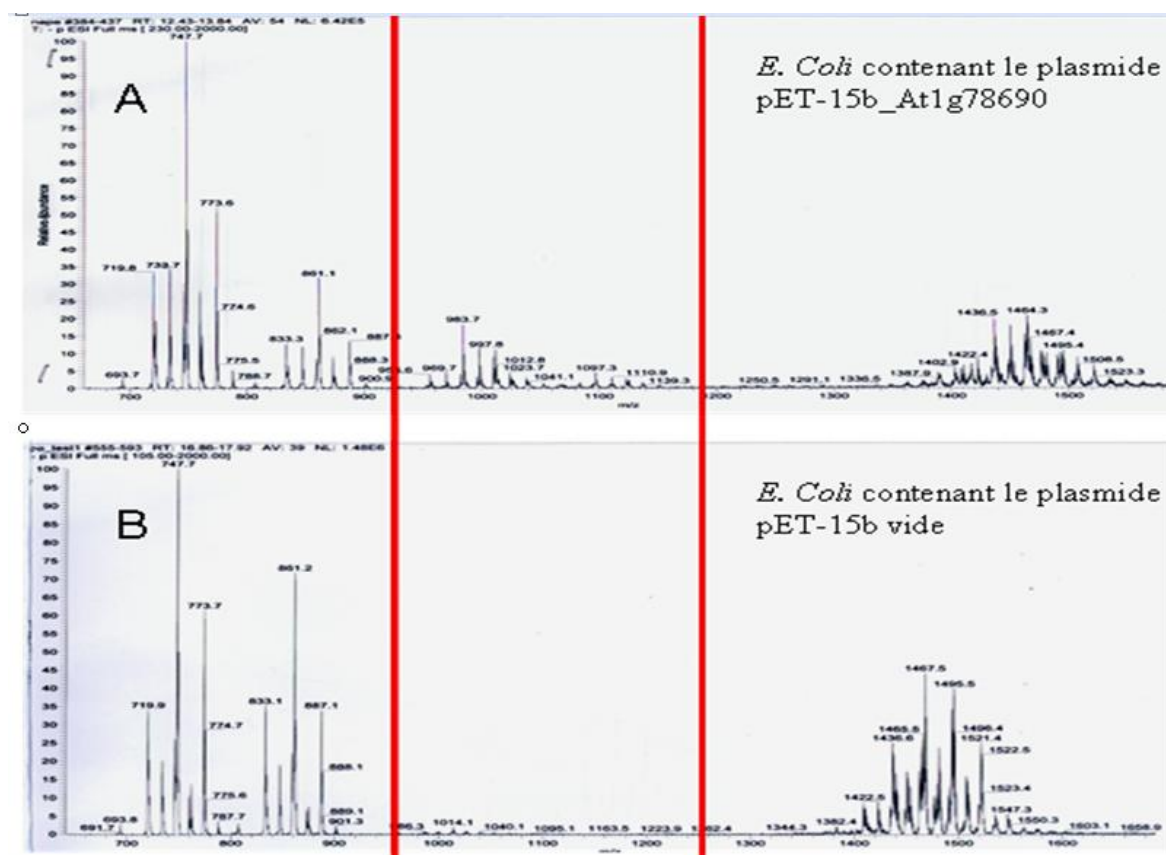


Figure IV-17. Spectre de masse obtenu par ESI-MS en mode négatif des lipides totaux des bactéries *E. coli* contenant le plasmide pET-15b vide ou pET-15b::At1g78690.

A, Analyse ESI-MS par injection directe des lipides totaux des bactéries *E. coli* contenant le plasmide pET-15b::At1g78690. B, Analyse ESI-MS par injection directe des lipides totaux des bactéries *E. coli* contenant le plasmide pET-15b vide.

Les spectres de deuxième fragmentation obtenus lors de cette étude présentent de fortes similitudes avec les spectres MS/MS de NAPE déjà étudiés par d'autres équipes (Sandoval *et al.*, 1995 ; Hansen *et al.*, 1999). A partir de ces différentes données de la littérature, il a été possible d'identifier la nature de différents fragments obtenus par MS/MS, et ainsi d'identifier plusieurs molécules comprises entre 900 et 1000 m/z.

Par exemple, il a été possible d'identifier dans le spectre MS/MS de l'ion à 980,6 m/z des fragments de masse de 253 et 281 m/z représentant respectivement les formes anioniques des acides gras C16:1 et C18:1. Il est à noter que la forme anionique positionnée en *sn2* d'un composé glycérol donne un signal plus élevé que l'espèce anionique retrouvée en position *sn1*. Ceci permet de déterminer le positionnement de ces groupes acyles sur un squelette glycérol comme celui de la NAPE (Hansen *et al.*, 1999). Ainsi, d'après le spectre MS/MS (figure IV-18), l'acide palmitoléique (C16:1) serait en position *sn2* et l'acide oléique (C18:1) en position *sn1*. Le fragment de 727 m/z représente la forme neutre de la molécule de NAPE sans l'acide palmitoléique. De même le fragment de masse 699 m/z correspond à la forme neutre de la molécule de NAPE sans l'acide oléique en *sn1*. De façon spécifique

chez les NAPE, la fragmentation des formes neutres de la molécule, due à la perte de l'un des acides gras du squelette phosphoglycérol, se poursuit par la libération de l'ion NAE, suite à la rupture de la liaison C-O. Cette rupture conduit à l'observation de l'ion à 389 m/z (forme neutre correspondant à l'acide oléique plus le squelette glycérol) et de l'ion à 417 m/z (forme neutre correspondant à l'acide palmitoléique plus le squelette glycérol). Si la position *sn1* est estérifiée par l'acide oléique et la position *sn2* par l'acide palmitoléique alors la seule possibilité pour obtenir une masse de 980,6 est d'avoir un acide stéarique en position amine. Le composé de masse/z égale à 980,6 est donc le N-stéarique-1-oléique-2-palmitoléique -phosphatidyléthanolamine (Figure IV-18).

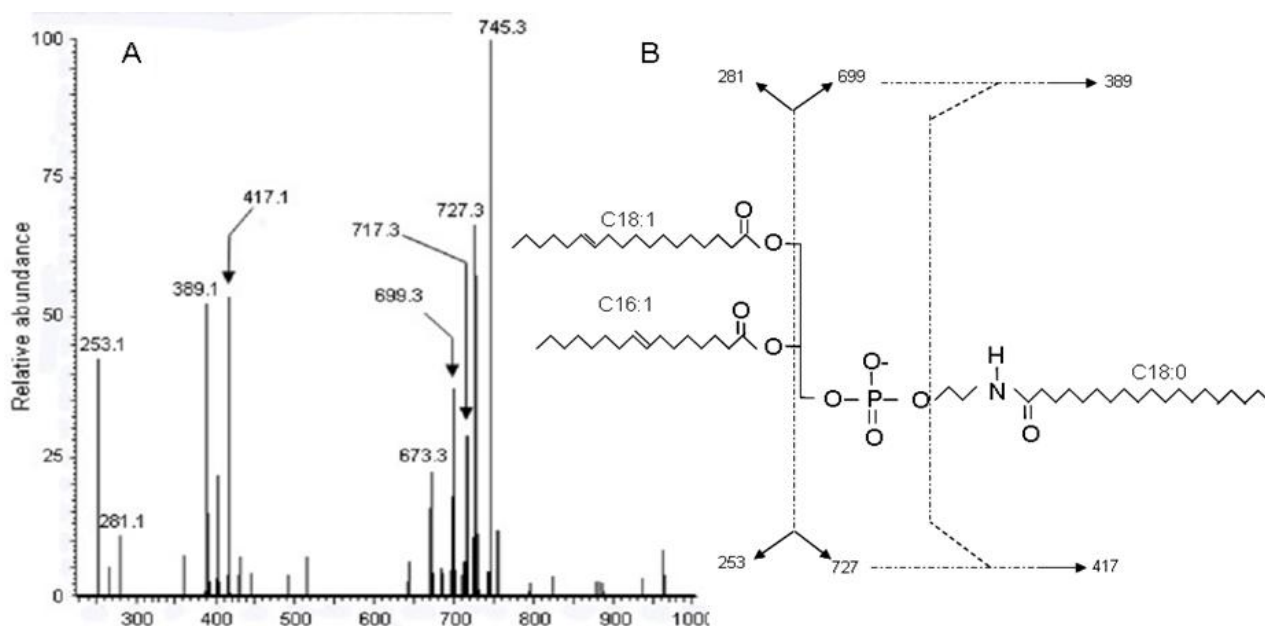


Figure IV-18. Spectre MS/MS en mode négatif et profil de fragmentation de l'espèce moléculaire à 980,6 m/z. (A), Spectre MS/MS en mode négatif de l'ion 980,6 : le N-stéarique-1-oléique-2-palmitoléique -phosphatidyléthanolamine. (B), Profil de fragmentation du N-stéarique-1-oléique-2-palmitoléique -phosphatidyléthanolamine. m/z, masse/charge.

Les spectres MS/MS des autres pics ont été obtenus selon le même processus de fragmentation (CID). Ainsi, lors de l'analyse du spectre MS/MS relatif à l'ion de masse 983,4 (m/z), différents ions caractéristiques ont été observés: 729, 699, 389, 419, 253, 283 (m/z). Ils ont permis d'identifier cette molécule comme étant du N-stéarique-1-stéarique-2-palmitoléique-phosphatidyléthanolamine (figure IV-19 A). Pour cette même masse de 983,4 (m/z), il a été possible d'observer un autre profil de spectre MS/MS légèrement différent du premier. La présence des ions 727, 701, 417, 391, 255, 281 (m/z), a permis de révéler la présence de N-stéarique-1-oléique-2-palmitique-phosphatidyléthanolamine (figure IV-19 B).

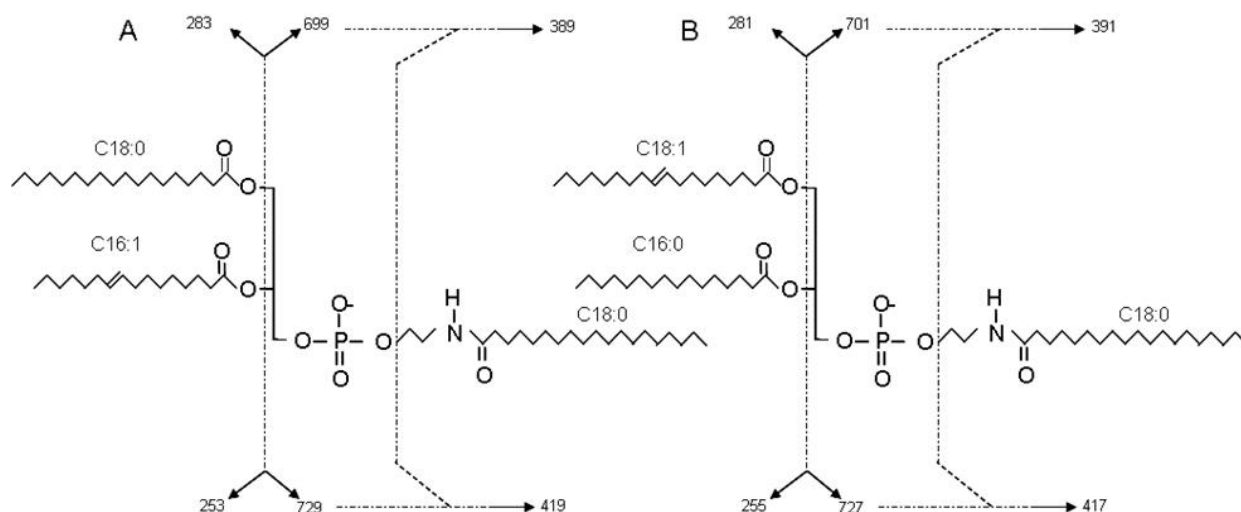


Figure IV-19. Profil de fragmentation (A) du N-stéarique-1-stéarique-2-palmitoléique-phosphatidyléthanolamine et (B) du N-stéarique-1-oléique-2-palmitique-phosphatidyléthanolamine, 983,4 m/z.

Un troisième spectre MS/MS a été obtenu lors de ces analyses. Il s'agit du spectre MS/MS associé à la masse 985,5 m/z. Les ions caractéristiques suivants ont été identifiés: 730, 702, 417, 389, 255 et 283 (m/z). L'ion 985,5 m/z est donc du N-stéarique-1-palmitique-2-stéarique-phosphatidyléthanolamine (figure IV-20).

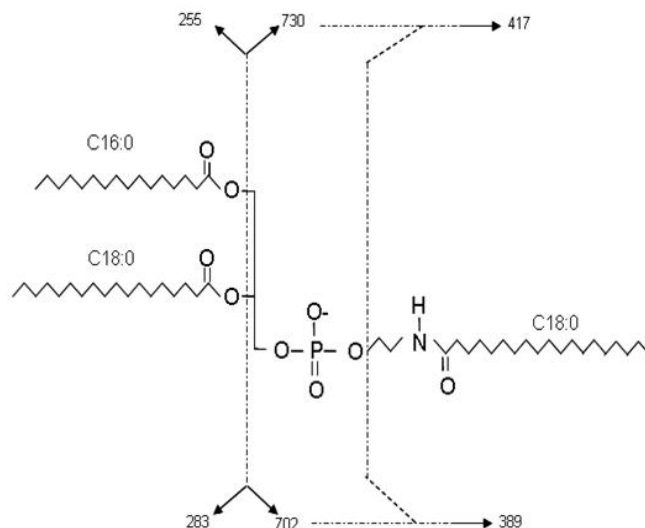


Figure IV-20. Profil de fragmentation de l'espèce moléculaire à 985,5 m/z : le N-stéarique-1-palmitique-2-stéarique-phosphatidyléthanolamine.

Les résultats obtenus par spectrométrie de masse ont donc permis de mettre en évidence chez les bactéries contenant le gène At1g78690 la présence de plusieurs NAPE ayant des compositions en acide gras variables en position *sn1* et *sn2* du squelette glycérol (18:0/16:0/18:0 ; 18:0/18:1/16:0 ; 18:0/18:0/16:1 ; 18:0/18:1/16:1 ; respectivement :

amine/sn1/sn2). Cette composition en acide gras en position *sn1* et *sn2* est en accord avec la composition en acides gras d'*E.coli* décrite dans la littérature (Brown *et al.*, 1971) : majoritairement du C16:0, C16:1 et C18:1 et avec une quantité plus faible de C18:0. Par ailleurs lors de nos analyses, la position amine est toujours acylée par du C18:0.

En résumé, les bactéries *E.coli* C41 (DE3) transformées par le plasmide pET-15b::At1g78690 présentent une augmentation de la synthèse d'un lipide par rapport aux bactéries *E.coli* C41 (DE3) transformées par le plasmide vide.

Différentes analyses, CCM mono et bidimensionnelles, test PLD, ou encore des analyses par spectrométrie de masse ont confirmé que ce lipide correspondait à des N-acylphosphatidyléthanolamines (NAPE).

***In vivo* l'expression de la protéine At1g78690p chez le modèle bactérien *E.coli* induit donc une synthèse de NAPE. Afin de confirmer et de caractériser cette activité NAPE synthase d'At1g78690p, des tests enzymatiques avec la protéine purifiée et avec des membranes bactériennes ont été effectués.**

3. Mesure *in vitro* de l'activité NAPE synthase de la protéine purifiée ou sur membranes d'*E. coli*

Nous avons ensuite cherché à confirmer *in vitro* l'activité NAPE synthase de la protéine At1g78690p en utilisant dans un premier temps la protéine d'intérêt purifiée par chromatographie sur colonne IMAC (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography).

3.1 Construction de la protéine de fusion At1g78690-6HIS.

Afin de purifier cette protéine par chromatographie IMAC, une protéine fusionnée à une étiquette 6 histidines (6HIS) a été produite à l'aide de la technologie de clonage Gateway. Le plasmide pDEST-17 a été utilisé pour cette construction (cf. « Matériels et Méthodes »). **Afin de faciliter la lecture de cette partie du travail, lorsque nous parlerons de 'bactéries transformées', il sera fait référence aux bactéries *E. coli* C41(DE3) transformées par le plasmide pDEST-17::At1g78690, et de 'bactéries témoins' pour faire référence aux bactéries *E. coli* C41(DE3) transformées par le plasmide pDEST-17 vide.**

3.1.1 Vérification par SDS-PAGE et Western blot de la présence de la protéine At1g78690p-6HIS dans les 'bactéries transformées'

L'expression de la protéine At1g78690-6HIS dans les 'bactéries transformées' a été vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE et Western blot. La présence de l'étiquette composée de 6 histidines et de la séquence de recombinaison *attB1* augmente en théorie la masse moléculaire de la protéine d'intérêt de 2,6KDa qui passe de 31,7KDa à 34,3KDa.

L'analyse par électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes des protéines totales des 'bactéries transformées', après induction à l'IPTG, confirme l'expression d'une protéine dans la gamme des 30 KDa, absente chez les 'bactéries témoins' (Figure IV-21.A).

Afin de confirmer que cette protéine correspond à la protéine de fusion, une révélation par immunoempreinte a été réalisée avec un anticorps monoclonal anti-poly-histidines de souris. Les résultats (figure IV-21.B) révèlent la présence dans les extraits 'bactéries transformées' d'une protéine reconnue par cet anticorps dont la masse correspond aux 34KDa attendus (pistes 5-8). Il est possible de noter la présence d'une seconde protéine reconnue par cet anticorps, dont la masse moléculaire est plus petite que la première et pouvant correspondre à un produit de dégradation de la protéine de fusion At1g78690-6HIS.

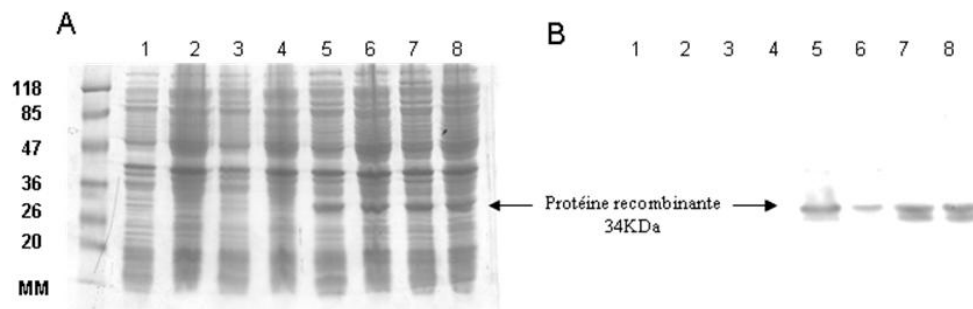


Figure IV-21. Gel SDS-PAGE et Western blot à partir d'extraits de protéines totales de 'bactéries transformées' et 'témoins'.

A, électrophorèse en conditions dénaturantes. Cent μ l d'extraits bactériens ont été centrifugés, repris dans 10 μ l de tampon de charge et déposés sur un gel de polyacrylamide à 12%. Après migration, le gel a été coloré au bleu de coomassie. B, Immunoempreinte avec un anticorps monoclonal anti-histidine de souris. Les pistes 1 à 4 (A ou B) correspondent aux extraits des 'bactéries témoins' induites 3h à l'IPTG (1mM); les pistes 5 à 8 correspondent aux extraits des 'bactéries transformées' induites 3h à l'IPTG (1mM) ; MM, marqueurs de masse moléculaire.

3.1.2 Mesure de l'activité *in vivo* de la protéine de fusion (At1g78690-6HIS) sur la synthèse de NAPE chez les 'bactéries transformées'

Afin de s'assurer que la présence de l'étiquette en N-terminal de la protéine de fusion n'inhibe pas son activité *in vivo*, une analyse de la composition lipidique des 'bactéries transformées' a été réalisée sur milieu LB contenant de l'acétate radiomarké et comparée

avec celle des bactéries transformées par le plasmide pET-15b::At1g78690 et avec celle des 'bactéries témoins'. La proportion de [^{14}C]-NAPE synthétisée par chaque souche de bactéries (pDEST-17::At1g78690 ou pET-15b::At1g78690) a été rapportée à la quantité totale de radioactivité incorporée soit [^{14}C]-NAPE / ([^{14}C]-NAPE + [^{14}C]-PE + [^{14}C]-PG + [^{14}C]-CL). Les valeurs déterminées ont été ensuite normalisées par rapport à la valeur obtenue avec les 'bactéries témoins'. Les résultats montrent que la quantité de NAPE dans les 'bactéries transformées' est multipliée par 3,5 par rapport aux 'bactéries témoins', mais qu'elle est deux fois plus faible que dans les bactéries C41(DE3) transformées par le plasmide pET15b::At1g78690 (figure IV-22).

L'hypothèse la plus simple pouvant être émise pour expliquer cette diminution de synthèse entre les bactéries transformées par le plasmide pDEST-17::At1g78690 et les bactéries transformées par le plasmide pET15b::At1g78690 est que la présence de l'étiquette 6HIS en N-terminal de la protéine entraîne une diminution des capacités catalytiques de l'enzyme.

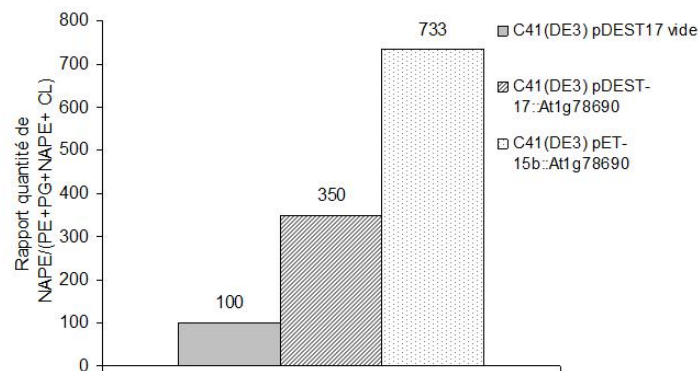


Figure IV-22. Mesure *in vivo* de la quantité de NAPE synthétisée chez différents clones de bactéries *E. coli*.

100ml de culture (en présence d' [^{14}C]-Acétate) de bactéries *E.coli* C41(DE3) contenant le plasmide pDEST17::At1g78690 ou pDEST17 vide ou encore pET-15b::At1g78690 ont été induits 3h avec de l'IPTG (1mM). 10ml de culture ont été utilisés pour l'analyse. Les lipides ont été extraits comme décrit dans la partie « Matériels et Méthodes », puis ont été déposés sur plaque CCM et séparés à l'aide d'un système de solvants polaires « Vitiello ». La quantité de radioactivité incorporée a été mesurée à l'aide d'un PhosphorImager et du logiciel ImageQuant.

En résumé, les 'bactéries transformées' par le plasmide pDEST-17::At1g78690 permettent l'expression de la protéine At1g78690p fusionnée avec une étiquette 6 histidines. Les analyses lipidiques sur milieu acétate radioactif montrent que cette protéine de fusion conserve son activité NAPE synthase chez *E.coli*. Cependant, la présence des 6 histidines en N-terminal de la protéine entraîne une diminution d'un facteur 2 de son activité NAPE synthase.

3.2 Mesure de l'activité de la protéine At1g78690p-6HIS purifiée par chromatographie d'affinité via un ÄKTAexplorer

Les protéines d'intérêt ont été purifiées par chromatographie sur colonne IMAC grâce à deux outils différents : un ÄKTAexplorer ou le kit Ni Sépharose 6 Fats Flow TM.

3.2.1 Purification de la protéine At1g78690-6HIS

Les purifications ont été réalisées à partir de 1 litre de culture de 'bactéries transformées' (*E. coli* C41(DE3) pDEST-17::At1g78690, cf. « Matériels et Méthodes »). Après centrifugation, les cellules ont été resuspendues dans un tampon d'équilibration (Tris HCl 50mM ; NaCl 0,5M ; CHAPS 8mM ; pH8) auquel on a ajouté la moitié d'une pastille de cocktail anti protéase (Proméga) pour éviter la dégradation des protéines d'intérêt. Après ajout de 1mM de PMSF, le mélange a été soniqué puis centrifugé à 10000g pendant 10min. Après centrifugation, le surnageant a été déposé sur la colonne IMAC équilibrée avec un tampon Tris HCl 50mM ; NaCl 0,5M ; CHAPS 8mM ; pH8.

Lors de ces purifications sur Akta, il a été possible de suivre la présence de protéines en sortie de la colonne par lecture de l'absorbance à 280nm. Afin d'éliminer les fixations aspécifiques ou faibles des différentes protéines sur la colonne, une première élution a été réalisée avec 95% de tampon d'équilibration et 5% de tampon d'élution (Tris HCl 50mM ; imidazole 0,5M ; 8mM CHAPS). Après élution des protéines aspécifiques, l'élution des protéines d'intérêt a été réalisée selon un gradient de concentration en tampon d'élution de 5 à 100%. A partir d'une concentration de 350mM en imidazole, des protéines ont été décrochées de la colonne et aliquotées en « fractions d'intérêt » de 1ml.

Afin de s'assurer de la présence de protéines purifiées dans les « fractions d'intérêt », des gels SDS-PAGE ont été réalisés (figure IV-23).

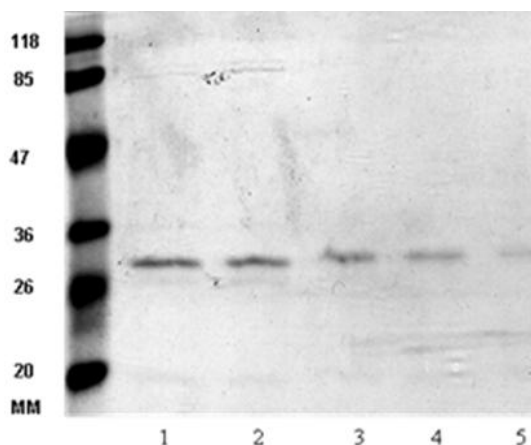


Figure IV-23. Gel SDS-PAGE des fractions d'élution obtenues lors de la purification de la protéine At1g78690-6HIS à l'aide d'un ÄKTAexplorer. 30µl de plusieurs « fractions d'intérêt » obtenues lors de la purification de la protéine At1g78690-6HIS ont été utilisés et mélangés à 30µl de tampon de charge. 30µl ont été alors déposés sur le gel de polyacrylamide 12% en conditions dénaturantes. Les pistes 1-5 correspondent à différentes « fractions d'intérêt » obtenues via la purification avec un ÄKTAexplorer. La révélation des protéines a été réalisée par coloration du gel au bleu de coomassie. MM marqueurs de masse moléculaire.

Les résultats obtenus indiquent que les fractions purifiées contiennent une protéine ayant la masse moléculaire attendue (figure IV-23), et comme précédemment (figure IV-21), la présence d'un « tag histidine » associé à cette protéine a été vérifiée par western blot (résultats non montrés). Afin de s'assurer de la nature de cette protéine, une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée à la plateforme de génomique fonctionnelle de Bordeaux. Les résultats de ces analyses sont présentés en annexe n°3 et confirment que cette protéine correspond bien à la protéine At1g78690p.

La protéine At1g78690-6HIS purifiée à l'aide d'un ÄKTAexplorer sur colonne IMAC a été utilisée non seulement pour la mise en place de tests enzymatiques mais aussi pour la réalisation d'anticorps anti-NAPE-synthase.

3.2.2 Réalisation d'anticorps anti-At1g78690-6HIS

Après purification et électrophorèse SDS PAGE, la bande correspondant à la protéine At1g78690-6HIS a été découpée puis envoyée à la société Covalab (www.covalab.fr) pour la réalisation de l'immunisation de lapins contre cette protéine. Des westerns blots ont été réalisés sur des extraits de protéines totales de 'bactéries transformées' à partir des anticorps polyclonaux synthétisés. Les résultats (figure IV-24) ont montré que ces anticorps reconnaissent une protéine dont la masse moléculaire (environ 34KDa) correspond à celle de la protéine d'intérêt.

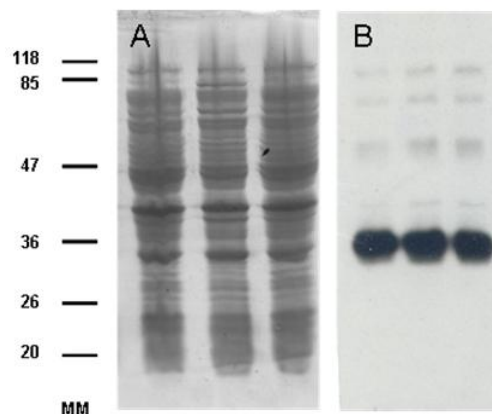


Figure IV-24. Gels SDS-PAGE et Western blot sur extraits de protéines totales de 'bactéries transformées'.

A, Gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes de protéines totales de 'bactéries transformées'. Cent µl d'extraits bactériens ont été centrifugés, repris dans 10µl de tampon de charge et déposés sur un gel de polyacrylamide à 12%. Après migration, le gel a été coloré au bleu de coomassie. B, Immunoempreinte avec un anticorps polyclonal anti-At1g78690-6HIS de lapin. MM, marqueurs de masse moléculaire.

Ainsi les anticorps polyclonaux obtenus sont relativement spécifiques envers la protéine et pourront être utilisés ultérieurement dans le cadre de nouveaux projets qui seront développés dans les perspectives de cette thèse.

3.2.3 Tests *in vitro* réalisés à partir de la protéine purifiée At1g78690-6HIS

Nous avons ensuite souhaité étudier *in vitro* l'activité de la protéine At1g78690-6HIS dans le but de confirmer son activité NAPE synthase et déterminer la nature du donneur d'acyle utilisé. Les tests enzymatiques ont été réalisés immédiatement après la purification. Dans un premier temps, les conditions expérimentales de ces tests ont été inspirées des travaux effectués par Kent. D. Chapman et son équipe sur l'étude *in vitro* de l'activité NAPE synthase de microsomes de coton (*Gossypium hirsutum*. L) (Chapman et Moore, 1993a et b). Lors de ces études, les conditions optimales de l'activité NAPE synthase ont été définies : agitation 120 rpm, température 40-45°C, tampon phosphate 20mM ; pH 8. Plusieurs donneurs d'acyles ont été étudiés et les acides gras libres se sont révélés être les donneurs d'acyles de l'acylation de la PE en NAPE.

Lors de nos travaux, nous avons utilisé deux donneurs d'acyles (acides gras libres et acyl-CoA). Une première série de tests a été réalisée dans un volume final de 500µl. Les protéines ont été incubées pendant 30 minutes à 40°C en présence de 1nmol de PE et de différents donneurs d'acyles comme l' [¹⁴C]-palmitoyl-CoA ([¹⁴C]-C16:0-CoA ; 60mCi.mmol⁻¹) ou l' [¹⁴C]-acide oléique ([¹⁴C]-C18:1 ; 54,6mCi.mmol⁻¹). Après extraction, les phospholipides ont été séparés par CCM et les produits radioactifs ont ensuite été analysés à l'aide d'un PhosphorImager. Aucune synthèse de NAPE en présence d' [¹⁴C]-C18:1 n'a été observée en absence ou en présence de protéines (figure IV-25). En revanche, une synthèse de NAPE a été mesurée en présence d'acyl-CoA (173pmol) et de protéines purifiées (figure IV-25).

Cependant, une synthèse de NAPE, plus faible, a été également mesurée en absence de protéines avec le substrat acyl-CoA. Ces expériences ont été renouvelées et des résultats similaires ont été observés. Ces résultats mettent évidence l'existence d'une synthèse chimique de NAPE à partir de PE et d'un acyl-CoA dans ces conditions expérimentales. L'hypothèse d'une catalyse chimique liée à l'imidazole a été formulée. En effet dans certaines conditions, l'imidazole peut catalyser la synthèse de liaison ester ou amide (Testet *et al.*, 2002). Nous avons donc examiné si dans nos conditions expérimentales, la quantité d'imidazole provenant du tampon d'élution des protéines purifiées pouvait catalyser la synthèse chimique de NAPE lors des tests *in vitro*.

3.2.4 Mesure de la synthèse chimique de NAPE catalysée par l'imidazole

Afin de vérifier l'effet catalyseur de l'imidazole, 1nmol de PE et 1nmol d' [¹⁴C]-palmitoyl-CoA ont été incubées dans un volume réactionnel de 200µl pendant 30 minutes à 40°C en présence soit de protéines purifiées, soit d'imidazole seul, à une concentration identique à celle des « fractions d'intérêt » (175mM). Les résultats obtenus montrent une

synthèse de NAPE identique en présence ou non de protéines (figure IV-26). Aucune synthèse de NAPE n'a été mesurée en présence d'un tampon phosphate 20mM (pH8) sans imidazole (figure IV-26). Ainsi la formation de NAPE en présence d' [14 C]-palmitoyl-CoA et de PE résulte d'une synthèse chimique catalysée par l'imidazole. La synthèse de NAPE mesurée en absence de protéine lors du test enzymatique, figure IV-25, s'explique donc par cette synthèse chimique due à la présence de l'imidazole dans le mélange réactionnel.

De plus, aucune synthèse de NAPE à partir d'un acide gras libre n'avait été observée lors des travaux réalisés sur l'étude de la synthèse non enzymatique de différents lipides, catalysée par l'imidazole (Testet *et al.*, 2002). Nous avons confirmé expérimentalement qu'aucune synthèse chimique de NAPE n'était possible dans ces conditions expérimentales en présence d'un acide gras libre en incubant 1nmol de PE et 4nmol d' [14 C]-oléique en présence de 175mM d'imidazole (40°C, 30min, 120rpm, pH8) (résultats non montrés).

Aucune synthèse de NAPE n'ayant été détectée lors des essais précédents en présence d'acides gras libres radiomarqués ([14 C]-C18:1), de PE et de protéines éluées (figure IV-25), nos résultats sont en contradiction avec ceux de Chapman *et al.* qui ont proposé les acides gras libres comme étant les substrats des NAPE-synthase chez les plantes (Chapman *et al.*, 1993). Cependant les inhibiteurs de protéases, comme le PMSF et le cocktail anti-protéases, utilisés lors de la purification des protéines pourraient être responsables de l'inhibition de la synthèse de NAPE à partir d'un acide gras libre lors de nos essais. En effet ces composés bloquent les sérines présentes dans le site catalytique des protéases pour inhiber leur activité de dégradation des protéines, et il a été montré qu'une sérine pouvait intervenir dans la fixation de l'acide gras libre pour la synthèse de NAPE chez le coton (Mc Andrew et Chapman, 1998). Ainsi l'utilisation de ces inhibiteurs durant la préparation des protéines At1g78690-6HIS pourrait être responsable de la perte d'activité de l'enzyme catalysant la synthèse de NAPE à partir de [14 C]-oléique et de PE.

De plus, la concentration en imidazole utilisée lors de l'élution des protéines étant responsable d'une catalyse chimique de NAPE en présence d'acyl-CoA dans les conditions expérimentales des tests enzymatiques, nous avons recherché de nouvelles conditions de purification ne nécessitant pas l'utilisation de PMSF ou de cocktail anti-protéase et nécessitant une concentration moins importante en imidazole.

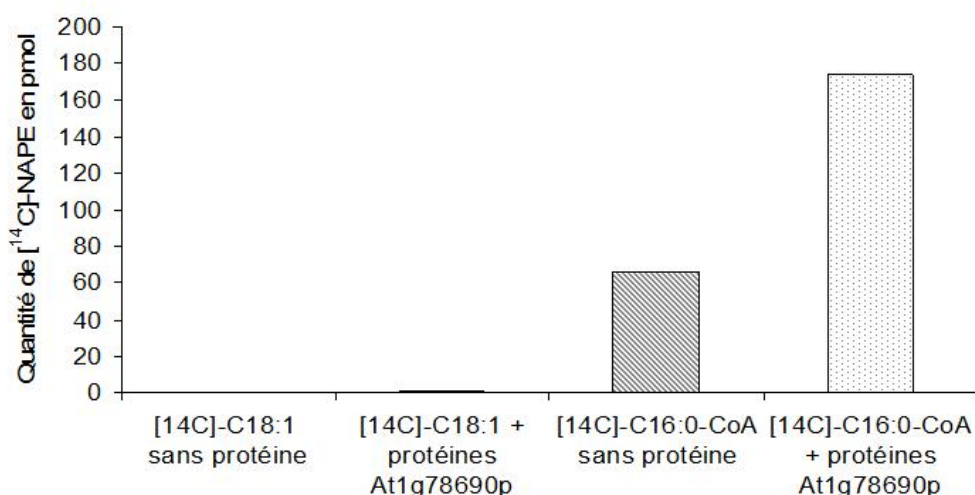


Figure IV-25. Effet du donneur d'acyle sur la synthèse *in vitro* de NAPE à partir de protéines purifiées.

Les essais ont été réalisés dans un volume réactionnel de 500 μl contenant 250 μl de tampon phosphate 20mM (pH8); CHAPS 8mM ; en présence de 250 μl de protéines purifiées (dans un tampon Tris HCl 20mM ; pH8 ; 8mM CHAPS ; 350mM Imidazole), ou de 250 μl de tampon d'élution sans protéine (tampon Tris HCl 20mM ; pH8 ; 8mM CHAPS ; 350mM Imidazole), de 1nmol de PE et de 4nmol d'un donneur d'acyle radioactif : [^{14}C]-acide oléique ou [^{14}C]-palmitoyl-CoA. Le mélange réactionnel a été incubé 30 min à 40°C, 120rpm. La réaction a été stoppée par ajout de 2ml de chloroforme/méthanol (2:1 ; v/v). Une fois les lipides extraits, ils ont été séparés par CCM à l'aide d'un système de solvants polaires « Vitiello ». La radioactivité a été mesurée à l'aide d'un PhosphorImager.

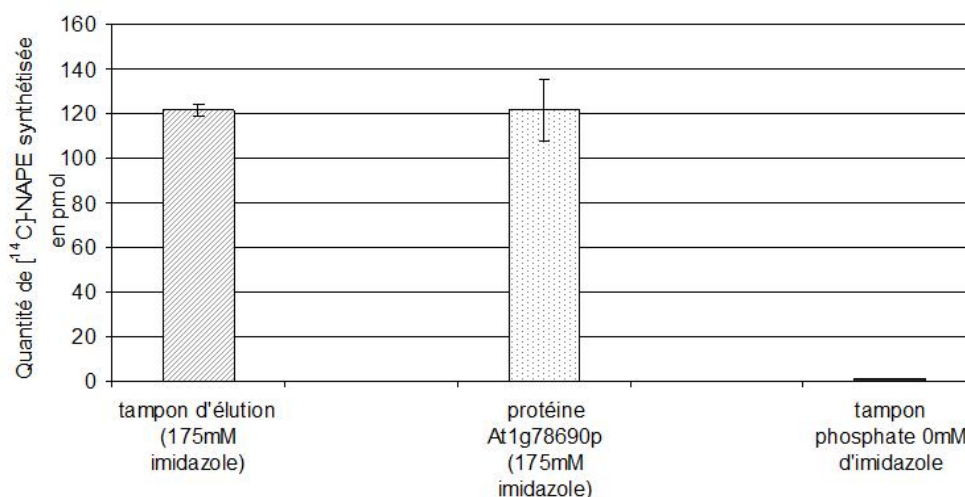


Figure IV-26. Effet de l'imidazole sur la synthèse chimique de NAPE.

Les essais ont été réalisés dans un volume réactionnel final de 200 μl de tampon phosphate 20mM (pH8), 8mM CHAPS, $\pm$ 175mM d'imidazole, de 1nmol de PE et de 1nmol d' [^{14}C]-palmitoyl-CoA, en présence ou non de protéines purifiées. Le mélange réactionnel a été incubé 30 min à 40°C (120rpm). Les réactions ont été stoppées par ajout de 2ml de chloroforme/méthanol (2:1 ; v/v). Une fois les lipides extraits, ils ont été séparés par CCM à l'aide du système de solvants « Vitiello ». La radioactivité a été mesurée à l'aide d'un PhosphorImager. Les résultats représentent la valeur moyenne de 3 par essais.

3.3 Mesure de l'activité de la protéine At1g78690-6HIS purifiée par chromatographie d'affinité via le kit Ni Sepharose 6 Fast Flow™

Le moyen le plus simple pour limiter la dégradation des protéines sans utiliser ces inhibiteurs est de réaliser la purification des protéines à 4 °C. Le système Akta ne pouvant être déplacé dans une chambre froide, des kits plus faciles à manipuler ont alors été utilisés, comme le kit Ni Sepharose 6 Fast Flow™.

3.3.1 Purification de la protéine At1g78690-6HIS à l'aide du kit Ni Sepharose 6 Fast Flow™

Tout comme pour la partie 3.2, les purifications ont été réalisées à partir d'1 litre de culture de 'bactéries transformées' (*E. coli* C41(DE3) pDEST-17::At1g78690, cf. « Matériels et Méthodes »). Après centrifugation, les bactéries ont été resuspendues dans un tampon d'équilibration (tampon phosphate 20mM ; NaCl 0,5M ; imidazole 25mM ; DDM 2mM ; pH 8). Un nouveau détergent non ionique, le DDM (CMC=0,16mM), compatible avec ce kit a été utilisé lors de ces purifications en remplacement du CHAPS (détergent zwiterionique). Ensuite les bactéries ont été soniquées à une seule reprise afin de fluidifier le mélange. Ce mélange a été ensuite centrifugé et le surnageant contenant les protéines d'intérêt a été déposé sur la colonne IMAC préalablement équilibrée avec le tampon d'équilibration. L'élution des protéines étiquetées a été réalisée à partir du tampon d'élution suivant : tampon phosphate 20mM ; 250mM imidazole ; 0,2mM DDM ; pH8. Les différentes fractions ont été ensuite analysées par SDS-PAGE de la même façon que pour les purifications à l'aide de l'ÄKTAexplorer (figure IV-27).

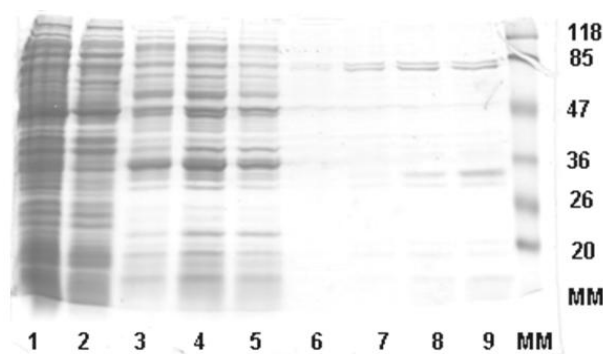


Figure IV-27. Gel SDS-PAGE des fractions obtenues lors de la purification de la protéine At1g78690-6HIS à l'aide du kit Ni Sépharose 6 Fast Flow™.

30µl de chaque fraction d'élution obtenue lors de la purification de la protéine At1g78690-6HIS ont été utilisés et mélangés à 30µl de tampon de charge. 30µl ont été alors déposés sur le gel de polyacrylamide à 12% en conditions dénaturantes. La révélation des protéines a été réalisée par coloration du gel au bleu de coomassie. 1, Extrait de protéines avant purification; 2-5, protéines éluées avec 25mM d'imidazole ; 6-9 protéines éluées avec 250mM d'imidazole.

Les fractions 8 et 9 contiennent une protéine dont la masse moléculaire est d'environ 34KDa ce qui correspond à la masse attendue pour la protéine At1g78690-6HIS. Afin de s'assurer de la nature de cette protéine, une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée à la plateforme de génomique fonctionnelle de Bordeaux. Les résultats obtenus ont confirmé que cette protéine correspondait bien à la protéine At1g78690p.

3.3.2 Tests enzymatiques avec la protéine At1g78690-6HIS purifiée à l'aide du kit Ni Sepharose 6 Fast Flow™

Etant donné que les inhibiteurs anti-protéases étaient peut-être responsables de l'inactivation de la synthèse de NAPE à partir d'acide gras libre, de nouveaux tests ont été réalisés avec 1nmol d' [14 C]-acide oléique et de 1nmol de PE en présence de protéines purifiées selon le nouveau protocole. Les essais ont été réalisés dans un volume final de 200 μ l à partir d'un tampon phosphate 20mM (pH8) et de 100 μ l de fraction purifiée pendant 30 minutes à 40°C. Après séparation des lipides par CCM, la radioactivité a été mesurée à l'aide d'un PhosphorImager. Les résultats obtenus mettent en évidence l'existence d'une activité de synthèse de NAPE en présence ou en absence de protéines (non montré). Ainsi il semblerait qu'avec ces nouvelles conditions expérimentales, une synthèse chimique de NAPE se produise en présence d'acide gras libre et de PE. L'imidazole ne peut être *a priori* responsable de cette synthèse chimique comme cela a été montré dans la figure IV-25 et lors des travaux de Testet *et al.*, (2002). L'hypothèse de l'implication des ions phosphates dans cette synthèse chimique a été formulée. Dès lors, une étude sur la synthèse chimique de NAPE a été réalisée en fonction de la concentration en tampon phosphate présent dans le milieu réactionnel. Les essais ont été réalisés dans un volume de 200 μ l pendant 30 minutes à 40°C. La concentration en phosphate a été modifiée par dilution avec un tampon Tris HCl 20mM (pH8). Les résultats obtenus montrent qu'en présence d'une concentration en tampon phosphate supérieure à 18mM, une synthèse chimique de NAPE à partir de PE et d'acide gras libre se produit (figure IV-28).

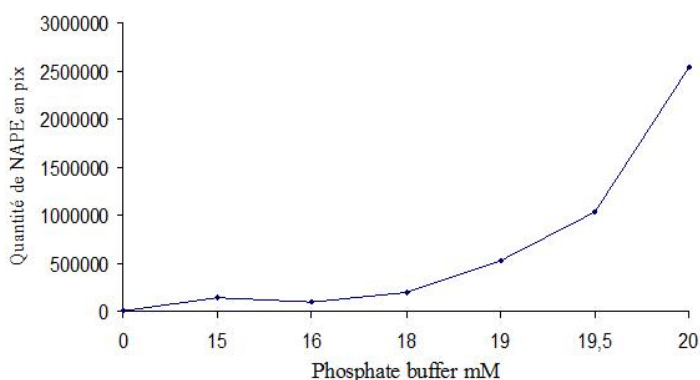


Figure IV-28. Effet de la concentration du tampon phosphate sur la synthèse chimique *in vitro* de NAPE. Les essais ont été réalisés dans un volume de 200 μ l dans un tampon phosphate 20mM (pH8), dilué par différentes quantités de tampon Tris HCl 20mM (pH8). Chaque essai a été réalisé avec 1nmol de PE et 1nmol d' [14 C]-acide oléique pendant 30 min à 40°C, 120rpm. Les réactions ont été stoppées par ajout de 2ml de chloroforme/méthanol (2:1 ; v/v). Les lipides ont été déposés sur plaque CCM et séparés à l'aide d'un système de solvants à base de pyridine (cf. « Matériels et Méthodes »). La radioactivité a été mesurée via un PhosphorImager.

Cette synthèse chimique ne pouvait être observée lors des premiers tests (figure IV-25) puisque l'ajout des protéines, éluées dans un tampon Tris-HCl, dans le mélange réactionnel diluait suffisamment la concentration du tampon phosphate pour empêcher cette synthèse (i.e. 10mM). En revanche dans ces nouveaux tests, le tampon d'élution à base de Tris HCl étant remplacé par un tampon à base de phosphate (20mM), l'ajout des protéines dans le mélange réactionnel ne diminue pas la concentration en phosphate, et une synthèse chimique de NAPE a lieu. Afin d'éviter cette synthèse chimique un tampon phosphate 10mM a été utilisé par la suite pour éluer les protéines.

3.3.3 Nouveaux tests enzymatiques à partir de la protéine At1g78690-6HIS purifiée

Comme indiqué précédemment, Chapman *et al.* (1993) ont montré une synthèse *in vitro* de NAPE optimale de 40°C à 45°C, en présence de microsomes de coton. C'est pour cette raison que nous avons travaillé à 40°C dans les expériences précédentes. Cependant, nous avons choisi de réaliser les essais suivants à 30°C, température plus conventionnelle pour ce genre d'expériences.

Les réactions ont été réalisées dans 100µl de tampon phosphate (10mM), pendant 10 minutes en utilisant comme enzyme la fraction protéique purifiée sur gel Ni Sepharose 6 Fast Flow™ en présence de 1nmol des différents donneurs d'acyles ([¹⁴C]-palmitoyl-CoA ou [¹⁴C]-C18:1) et de 1nmol de PE.

Dans ces conditions, la présence de deux lipides identifiés comme étant de la NAPE et de la PE a été visualisée. Cette synthèse de NAPE n'a été observée que lors des essais avec de l' [¹⁴C]-palmitoyl-CoA et en présence de la protéine purifiée (figure IV-29 A, piste 4). Aucune synthèse de NAPE n'a été observée en présence d'acide gras libre et de protéine après 10 minutes de réaction (figure IV-29 A, piste 2).

Il a été vérifié dans ces nouvelles conditions expérimentales (30°C, 10 minutes) que la concentration en imidazole présente lors des tests (125mM) ne permettait pas une synthèse chimique de NAPE à partir d' [¹⁴C]-C16:0-CoA et de PE (figure IV-29B). Ainsi la synthèse de NAPE observée figure IV-29 A apparait exclusivement due à une catalyse enzymatique.

Afin de confirmer l'activité NAPE synthase de la protéine d'intérêt et de s'assurer que cette activité est exclusivement associée à cette protéine, de nouveaux essais ont été réalisés à partir d'un nouveau lot de protéines purifiées et de protéines de la fraction « non retenue » (FNR) (figure IV-30).

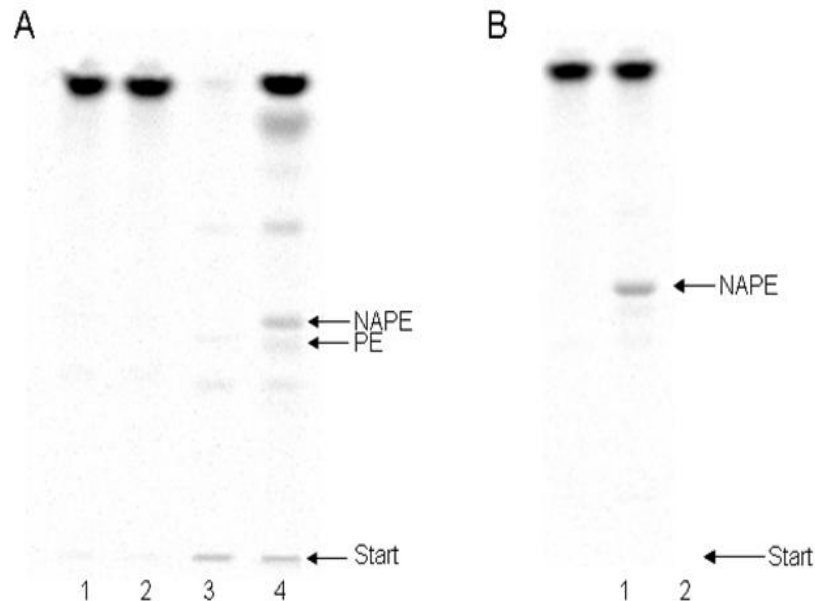


Figure IV-29. Effet du donneur d'acyle sur la synthèse de NAPE à partir de protéines purifiées.

A, Les essais ont été réalisés dans 100μl de tampon phosphate (10mM, pH8) contenant 0,2mM de DDM, 50μl de la 'fraction d'intérêt', 1nmol de PE et 1nmol d'un donneur d'acyle. Les essais ont été incubés à 30°C sous agitation 120rpm. Piste 1, essai à 0 min avec 1nmol d' [14 C]-acide oléique ; Piste 2, essai 10 min avec 1nmol d' [14 C]-acide oléique ; Piste 3, essai à 0 min avec 1nmol d' [14 C]-palmitoyl-CoA ; Piste 4, essai 10 min avec 1nmol d' [14 C]-palmitoyl-CoA. B, essai réalisé en présence de 1nmol d' [14 C]-palmitoyl-CoA et de 1nmol de PE ; piste 1 sans protéine + 50μl de tampon d'élution; piste 2 avec 50μl de « fraction d'intérêt ». Les lipides ont été séparés par CCM à l'aide d'un système de solvants polaires « Vitiello ». La radioactivité a été mesurée via un PhosphorImager.

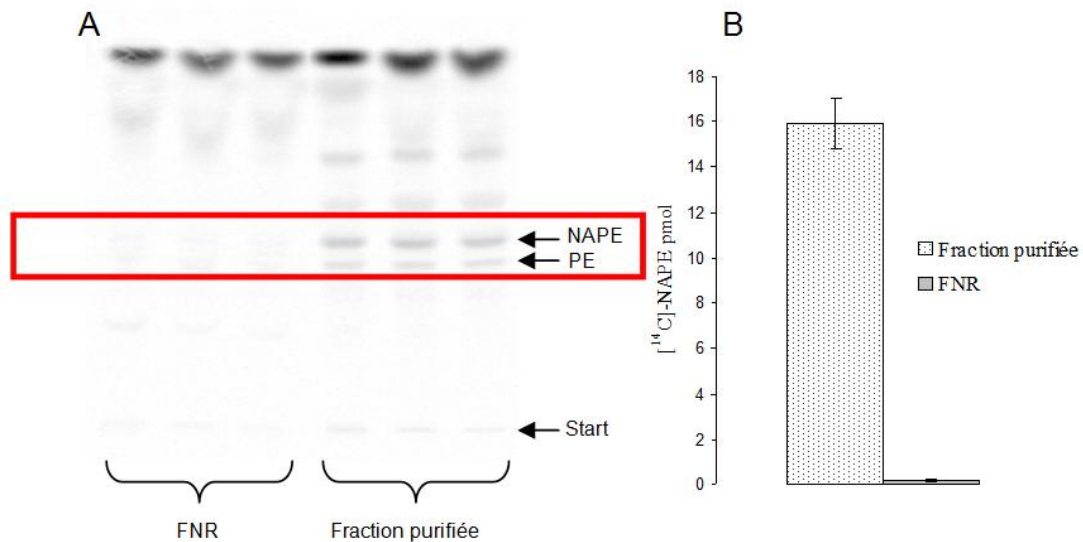


Figure IV-30. Analyse *in vitro* de la synthèse de NAPE en fonction de différentes fractions obtenues lors de la purification de la protéine At1g78690-6HIS.

Les essais ont été réalisés dans 100μl de tampon phosphate (10mM, pH8), 0,2mM DDM contenant, 40μg de protéines, 1nmol de PE et 1nmol d' [14 C]-palmitoyl-CoA. Les lipides ont été séparés par CCM à l'aide d'un système de solvants polaires « Vitiello ». La radioactivité a été mesurée via un PhosphorImager. A, plaque CCM des produits de réaction des tests sur « fractions non retenues » (FNR) et sur protéines purifiées (fraction purifiée). Les tests ont été réalisés trois fois dans chaque condition; B, Quantité de NAPE synthétisée pendant l'essai (en pmol) avec la FNR et la fraction purifiée. Les résultats représentent la valeur moyenne de 3 analyses par essai.

Les essais ont été réalisés à partir de 40µg de protéines (FNR ou « fraction d'intérêt »), pendant 10 minutes à 30°C en présence de 1nmol d' [¹⁴C]-palmitoyl-CoA et de 1nmol de PE. Les produits de la réaction ont été extraits puis séparés par CCM et analysés à l'aide d'un PhosphorImager. Il apparaît que seuls les essais en présence de protéines purifiées et d' [¹⁴C]-palmitoyl-CoA conduisent à une synthèse de NAPE (figure IV-30). La synthèse de NAPE mesurée en présence des protéines de la « fraction non retenue » est très faible (0,5 pmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines) par rapport à celle mesurée avec les protéines purifiées (40 pmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéines). L'activité NAPE synthase de la fraction purifiée est ainsi enrichie d'un facteur 80 par rapport à la « fraction non retenue » (figure IV-30).

3.3.4 Mesure de l'activité NAPE synthase sur protéines purifiées en fonction de la taille de chaîne et du degré d'insaturation du donneur d'acyle

Différents essais ont été réalisés dans ces mêmes conditions expérimentales avec 1nmol de plusieurs donneurs d'acyles comme le [¹⁴C]-palmitoyl-CoA, le [¹⁴C]-stéaroyl-CoA, l' [¹⁴C]-oléoyl-CoA, ou encore l' [¹⁴C]-acide palmitique ou l' [¹⁴C]-acide stéarique. Les essais ont été réalisés en présence de 40µg de protéines pendant 10 minutes à 30°C. Les produits de réaction ont été extraits puis analysés par CCM. Les résultats (figure IV-31) montrent que quelque soit l'acyl-CoA utilisé, une synthèse de NAPE est observée en présence des protéines purifiées. L'activité spécifique de la protéine At1g78690-6HIS lors de ces essais peut atteindre 10pmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine en fonction de la nature de l'acyl-CoA utilisé. Une très faible synthèse de NAPE a été mesurée (0,6pmol.min⁻¹.mg⁻¹) avec l' [¹⁴C]-acide palmitique ou l' [¹⁴C]-acide stéarique en présence de la protéine At1g78690-6HIS.

Il est possible de noter que la quantité de NAPE synthétisée lors de ces nouveaux essais est jusqu'à 4 fois plus faible que lors des essais précédents (figure IV-30). Cette différence peut être due à une dénaturation plus importante des protéines d'intérêt lors de ces nouveaux essais.

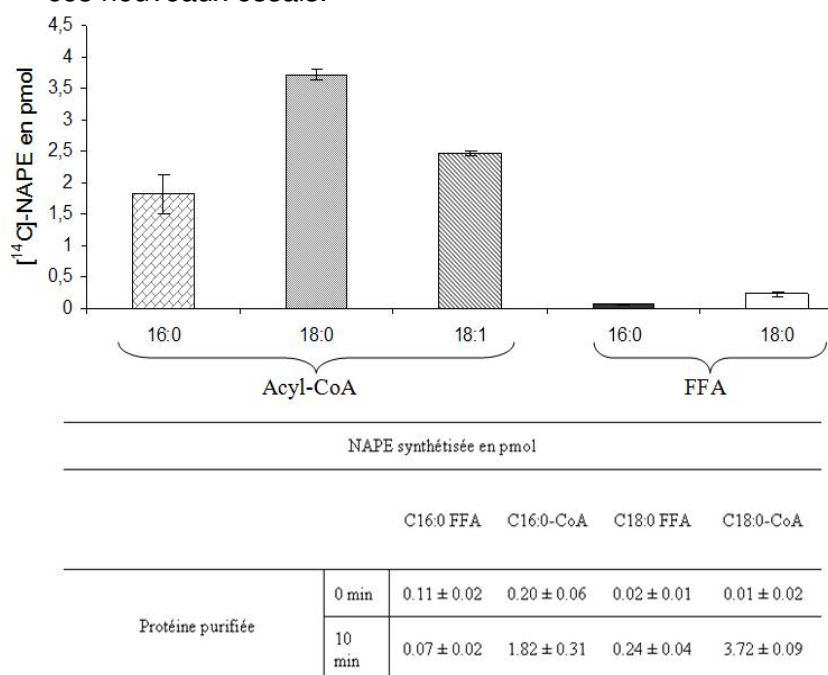


Figure IV-31. Mesure de la quantité de NAPE synthétisée *in vitro* en présence de protéines purifiées et de différents donneurs d'acyles. Les essais ont été réalisés dans 100µl de tampon phosphate (10mM, pH 8) contenant 0,2mM DDM, 1nmol de PE, 1nmol du donneur d'acyle et 40µg de protéines pendant 10 min à 30°C sous agitation (120rpm). Les lipides ont été déposés sur plaque CCM et séparés à l'aide du système de solvants « Vitiello ». La radioactivité a été mesurée *via* un PhosphorImager. Les résultats représentent la valeur moyenne de 3 essais.

Pour résumer, une synthèse chimique de NAPE à partir de PE et d'acide gras libre ou d'acyl-CoA a été mise en évidence dans diverses conditions expérimentales. En présence d'acyl-CoA, cette synthèse de NAPE a été mesurée en présence de 175mM d'imidazole dans un tampon tris HCl 20mM, pH8 à 40°C. Tandis qu'en présence d'acide gras libre, une catalyse chimique de NAPE a été observée à 40°C dans d'un tampon phosphate dont la concentration est supérieure à 18mM.

Ces diverses expériences ont également permis de déterminer des conditions expérimentales permettant de mesurer l'activité NAPE synthase de la protéine At1g78690-6HIS purifiée. Cette synthèse enzymatique de NAPE a été observée exclusivement en présence d'acyl-CoA. Or comme nous l'avons vu dans la partie « Données Bibliographiques », il a été proposé que la synthèse de NAPE chez les plantes résulte d'une acylation directe de la PE avec un acide gras libre (Chapman *et al.*, 1993b).

Devant cette différence entre nos résultats (acylation par des acyl-CoA) et ceux obtenus par Chapman *et al.*, (1993b) (acylation par des acides gras libres), nous avons cherché à savoir si l'absence d'activité que nous constatons en utilisant les acides gras libres ne résultait pas d'un changement de conformation de la protéine une fois solubilisée et purifiée et/ou plus généralement d'une absence d'environnement membranaire (hydrophobe) autour de l'enzyme. Pour cela, nous avons repris les études menées avec l'enzyme purifiée pour les mener avec des fractions membranaires d'*E. coli* exprimant (ou non) la protéine d'intérêt.

3.4 Mesure de l'activité d'At1g78690p *in vitro* à partir d'extraits de membranes d'*E. coli*

3.4.1 Premier test réalisé à partir d'acyl-CoA

Les conditions expérimentales déterminées pour mesurer la synthèse de NAPE catalysée par la protéine purifiée ont été utilisées pour réaliser des tests avec des préparations de membranes d'*E. coli* C41(DE3) transformées cette fois-ci par le plasmide pET-15b::At1g78690 ou pET-15b vide. La présence de la protéine d'intérêt dans les extraits de membranes de bactéries transformées par le plasmide contenant la séquence du gène d'intérêt ainsi que la présence de NAPE ont été vérifiées par SDS-PAGE et CCM. Les résultats obtenus ont confirmé la présence de la protéine d'intérêt et de NAPE exclusivement dans les membranes des bactéries transformées par le gène d'intérêt.

Les tests *in vitro* ont été réalisés avec de 50µg de protéines membranaires à 30°C pendant 10 minutes dans un tampon phosphate (10mM, pH8) en présence de 1nmol de

C18:1-CoA. Après extraction des lipides, les phospholipides ont été séparés par CCM et les produits radioactifs ont ensuite été analysés à l'aide d'un PhosphorImager.

Les résultats présentés figure IV-32 montrent qu'en présence d' [^{14}C]-oléoyl-CoA les membranes d'*E.coli* contenant At1g78690p sont capables de synthétiser deux lipides radioactifs identifiés comme étant de la PE et de la NAPE. Ces résultats sont très similaires avec ceux obtenus sur protéines purifiées (figures IV-30 et IV-31). Il est également possible d'observer la présence d'une bande radioactive supplémentaire (figure IV-32). Cette bande X est retrouvée systématiquement après de nombreuses analyses CCM suite à des expériences réalisées avec des préparations de membranes incubées en présence d' [^{14}C]-oléoyl-CoA, que ces membranes contiennent (figure IV-32 A) ou non la protéine d'intérêt (figure IV-32 B).

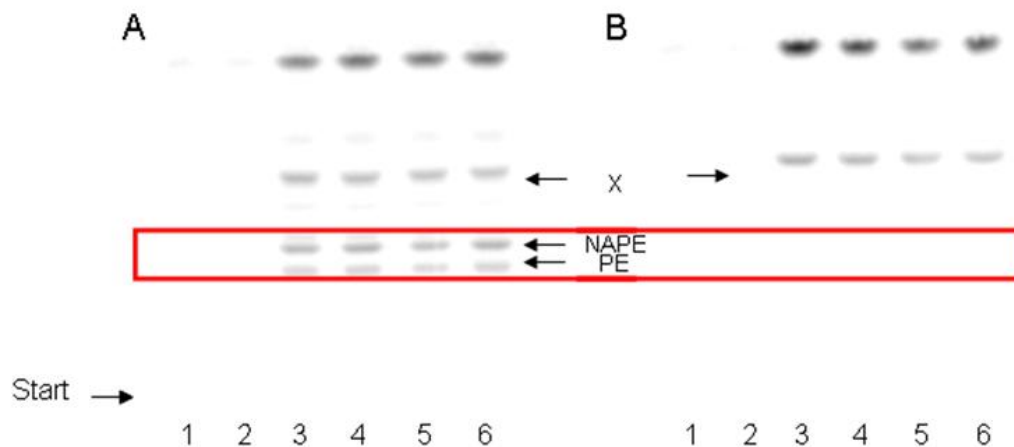


Figure IV-32. Synthèse *in vitro* de NAPE catalysée par des fractions membranaires d'*E. coli* transformée par le vecteur *pET15b* ::At1g78690 en présence de PE et d'acyl-CoA.

Les essais ont été réalisés à partir de 50µg de protéines membranaires dans un volume final de 100µl contenant du tampon phosphate (10mM, pH8), 1nmol d' [^{14}C]-oléoyl-CoA. Les essais ont été réalisés à 30°C pendant 10 minutes sous agitation (120 rpm). Les réactions ont été stoppées par ajout de 2ml de chloroforme/méthanol (2:1 ; v/v). Les lipides ont été déposés sur plaque CCM et séparés à l'aide d'un système de solvants polaires « Vitiello ». La radioactivité a été mesurée via un PhosphorImager. A, essais avec membranes contenant la protéine At1g78690p ; Pistes 1-2, 0 minute d'incubation ; Pistes 3-6, 10 minutes d'incubation. B, essais avec membranes sans la protéine At1g78690p ; Pistes 1-2, 0 minute d'incubation ; Piste 3-6, 10 minutes d'incubation.

3.4.2 Mesure *in vitro* de l'activité NAPE synthase à partir d'extraits de membranes d'*E. coli* en fonction de la taille et du degré d'insaturation du donneur d'acyle.

Différents donneurs d'acyles ont été testés pour la synthèse de NAPE à partir de ces extraits membranaires. Les différents substrats ([^{14}C]-acide palmitique, [^{14}C]-acide stéarique, [^{14}C]-palmitoyl-CoA, [^{14}C]-stéaroyl-CoA, [^{14}C]-oléoyl-CoA) ont été incubés avec 50µg de protéines membranaires à 30°C pendant 10 minutes. Après extraction des lipides, les phospholipides ont été séparés par CCM et les produits radioactifs ont ensuite été analysés à l'aide d'un PhosphorImager.

Les résultats obtenus figure IV-33 ont confirmé que seuls les acyl-CoA sont utilisés pour la synthèse de NAPE *via* la protéine d'intérêt (pour le C18:0-CoA= 68pmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine). L'enzyme ne semble pas présenter une forte spécificité pour la longueur de chaîne ou pour le degré d'insaturation puisque la synthèse est identique avec les 3 acyl-CoA utilisés.

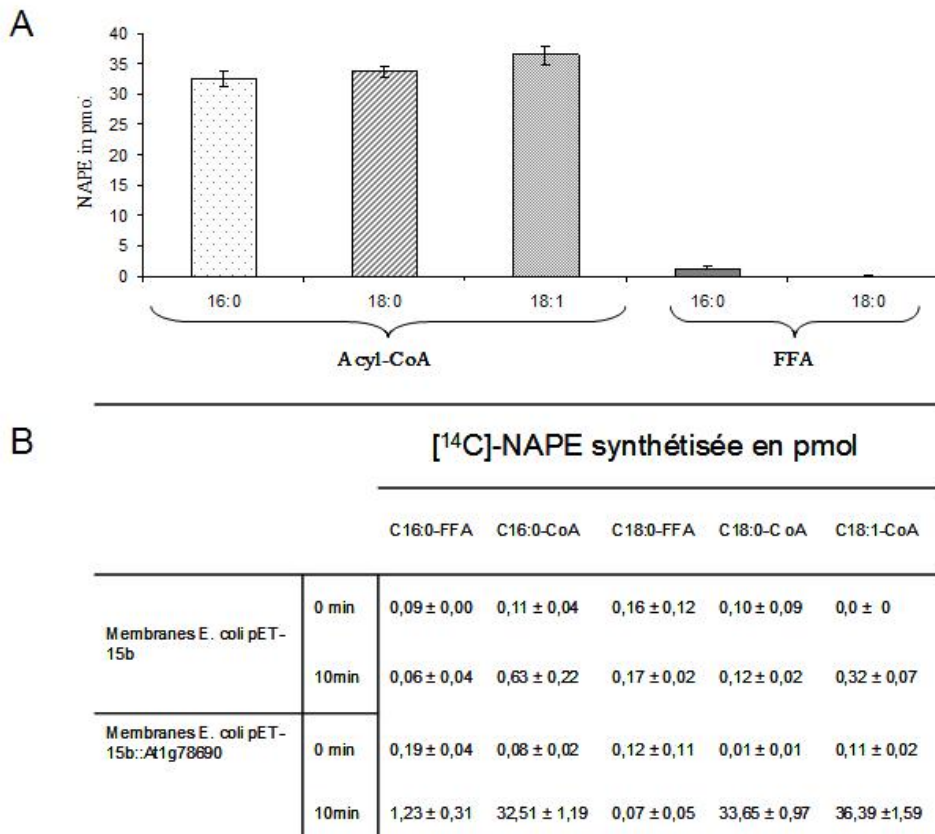


Figure IV-33. Analyse de la quantité de NAPE synthétisée en fonction du substrat sur des préparations de membranes contenant la protéine d'intérêt ou non.

Les essais ont été réalisés dans de 100µl de tampon phosphate (10mM, pH8) contenant 50µg de protéines membranaires et 1nmol de substrat radioactif. Les essais ont été réalisés à 30°C pendant 10 minutes. A, Quantité de NAPE synthétisée à partir de préparations de membranes contenant les plasmides pET-15b::At1g78690 en fonction du donneur d'acyle. B, Quantité de NAPE synthétisée en fonction du type de membrane, du donneur d'acyle et du temps d'incubation. Les réactions ont été stoppées par ajout de 2ml de chloroforme/méthanol (2:1 ; v/v). Les lipides ont été déposés sur plaque CCM et séparés à l'aide d'un système de solvants polaires « Vitiello ». La radioactivité a été mesurée *via* un PhosphorImager. Les résultats représentent la valeur moyenne de 3 essais.

On peut noter que l'activité NAPE synthase mesurée à partir d'extraits de membranes d'*E. coli* transformées par le plasmide pET-15b::At1g78690 est augmentée d'un facteur 6 à 7 par rapport à l'activité NAPE synthase mesurée en présence de protéines purifiées. Pour rappel, lors de la mesure de l'activité *in vivo* des protéines At1g78690-6HIS dans les bactéries C41(DE3) transformées par le plasmide pDEST-17::At1g78690, il a été montré que ces bactéries avaient une activité de synthèse de NAPE deux fois plus faible que celle des bactéries transformées par le plasmide pET-15b::At1g78690. Il a été suggéré que l'étiquette 6HIS pouvait être responsable de cette réduction de l'activité. Ceci pourrait

expliquer en partie l'activité plus faible mesurée avec les protéines purifiées. De plus, les protéines purifiées sur colonne IMAC ne sont très certainement pas dans une conformation favorable à une bonne activité enzymatique par rapport à des protéines insérées dans des membranes. Enfin, les protéines membranaires utilisant des substrats amphiphiles ont très souvent une activité moindre lorsqu'elles sont solubilisées par rapport à leur activité associée aux membranes biologiques (Bessoule *et al.*, 1989). Il n'est donc pas étonnant de mesurer une activité de synthèse de NAPE plus faible avec des protéines purifiées qu'avec les protéines insérées dans les membranes.

3.4.3 Cinétique de synthèse *in vitro* de NAPE à partir d'extraits de membranes d'*E. coli*

La cinétique de synthèse de NAPE à partir de 50µg d'extraits de membranes d'*E. coli* C41(DE3) transformées par le plasmide pET-15b::At1g78690 a été étudiée en présence d'1nmol d' [¹⁴C]-oléoyl-CoA. Les résultats obtenus ont permis d'observer une augmentation de la quantité de [¹⁴C]-NAPE mais aussi de [¹⁴C]-(PE+PG) qui est maximale au bout de 6 minutes et qui décroît par la suite (figure IV-34). Aucune synthèse de ces lipides n'a été mesurée à partir des extraits de bactéries transformées par le plasmide vide.

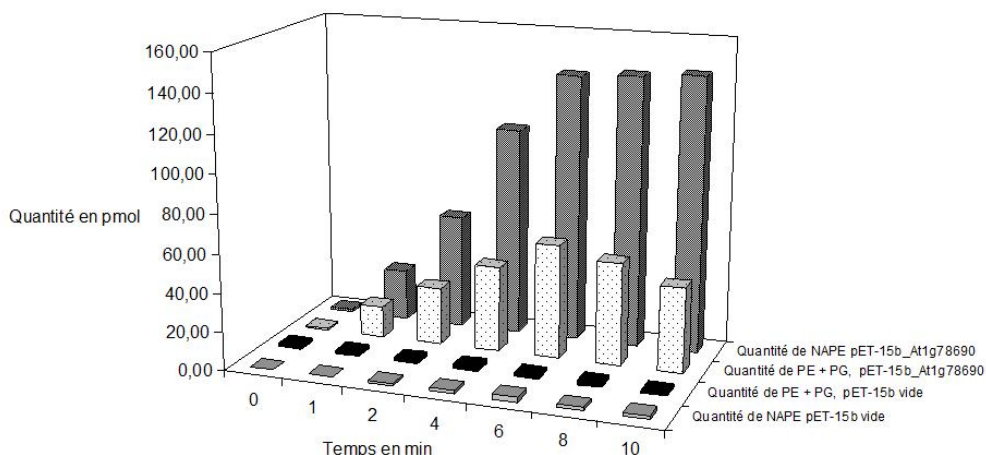


Figure IV-34. Cinétique de synthèse *in vitro* de NAPE et de (PE+PG) synthétisées à partir d'acyl-CoA sur des extraits de protéines membranaires.

Les essais ont été réalisés dans 100µl de tampon phosphate (10mM, pH8) contenant 50µg de protéines membranaires et 1nmol d' [¹⁴C]-oléoyl-CoA. Les réactions ont été stoppées par ajout de 2ml de chloroforme/méthanol (2:1 ; v/v) à différents temps. Les lipides ont été déposés sur plaque CCM et séparés à l'aide d'un système de solvants polaires « Vitiello ». La radioactivité a été mesurée *via* un PhosphorImager.

At1g78690p peut donc non seulement synthétiser de la NAPE, mais peut aussi synthétiser de la PE/PG à partir des LPE et LPG endogènes des membranes, ou alors remodeler les chaînes d'acides gras de ces deux derniers phospholipides, à partir du substrat [¹⁴C]-acyl-CoA. Les résultats de ces tests *in vitro* sur extraits de membranes d'*E. coli*

transformées par le plasmide pET-15b::At1g78690 sont en accord avec les résultats des expériences de dilution isotopique (figure IV-10). Effectivement, lors de ces tests, il a été observé que la protéine At1g78690p pouvait acyler des résidus lysophospholipidiques comme la LPE et la LPG en PE et PG.

Les essais sur préparations de membranes d'*E.coli* transformées par le plasmide vide (pET-15b) ont montré une synthèse quasi-nulle de NAPE à partir d'acides gras libres ou d'acyl-CoA radiomarqués. *A contrario*, une synthèse de NAPE est observée à partir d'extraits de membranes d'*E.coli* exprimant la protéine d'intérêt uniquement en présence d' [¹⁴C]-acyl-CoA.

Ces données ont permis de confirmer l'activité NAPE synthase de la protéine d'intérêt à partir de PE et d'un substrat acyl-CoA. Aucune spécificité en fonction de la nature de l'acyl-CoA n'a été observée lors de ces essais.

4 Etude fonctionnelle de la protéine At1g78690p chez *Arabidopsis thaliana*

La dernière partie de ce rapport décrit la caractérisation fonctionnelle de la protéine At1g78690p chez le modèle *Arabidopsis thaliana*. Pour cela l'étude de différents mutants, « perte de fonction » (ADN-T) et « surexpressueur » (« 35S »), a été réalisée.

4.1 Etude de la composition lipidique du mutant d'*Arabidopsis thaliana* perte de fonction (ADN-T) pour le gène d'intérêt

4.1.1 Mesure par RT-PCR quantitative du taux de transcrit du gène At1g78690 chez les plantes ADN-T

L'ADN-T du mutant SALK_029716 est inséré au niveau de la région promotrice du gène At1g78690 comme représenté figure IV-35.

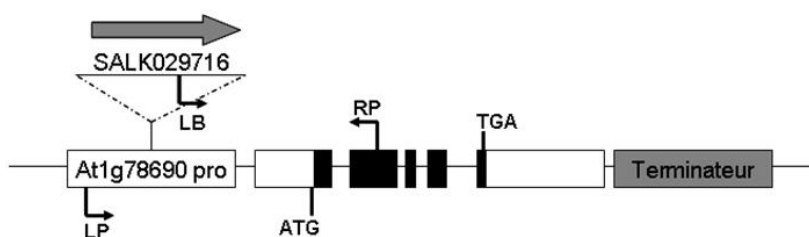


Figure IV-35. Représentation de l'insertion de l'ADN-T dans le gène At1g78690. Les exons sont représentés sous forme de boîtes noires. Les parties blanches représentent les régions 5' et 3' non traduites. Les amorces PCR utilisées pour la caractérisation du mutant sont indiquées sous forme de flèches (LP, RP et LB).

Des expériences de RT-PCR quantitative ont permis de confirmer que l'expression du gène At1g78690 est éteinte dans les lignées SALK 029716 homozygotes purifiés comme décrit dans la partie « Matériels et Méthodes » (figure IV-36). En effet, l'abondance relative du gène chez ces plantes mutantes est diminuée de plus de 20 fois par rapport aux plantes sauvages, et son taux est évalué à 0,05 à l'aide de l'iCycler iQ (BIORAD). Cette valeur est classiquement retrouvée lors de l'analyse du taux de transcrits chez différents mutants pour différents gènes. Il a donc été estimé que cette valeur représentait le bruit de fond mesuré lors des analyses avec ce type d'appareil.

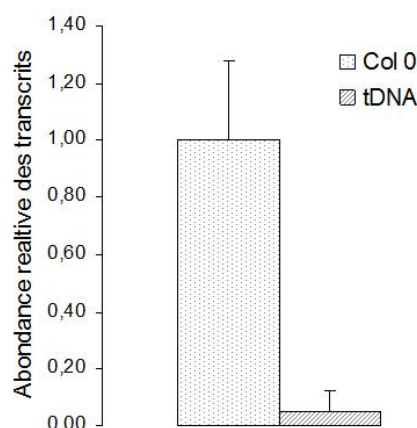


Figure IV-36. Abondance relative des transcrits du gène At1g78690, mesurée par RT-PCR quantitative, entre les plantes mutantes ADN-T et les plantes Col0. Les ARN ont été extraits à l'aide du kit RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Les ADNc ont été synthétisés avec la reverse-transcriptase SuperScript™ II RT (Invitrogen) suivi d'une digestion à la DNase I (DNA Free kit, AMBION). Les expériences de PCR quantitative ont été réalisées avec l'appareillage iCycler iQ (BIORAD) en utilisant du SYBR green® comme fluorophore. Les taux d'expression du gène ont été normalisés avec les transcrits de l'actine 2 et d'EIF4-1 comme contrôles. Les résultats représentent la valeur moyenne de 3 essais.

4.1.2 Effet de l'absence de transcrit du gène d'intérêt sur la composition lipidique d'*A. thaliana*

Les résultats des tests d'activités *in vivo* chez les bactéries *E.coli* transformées par le plasmide pET-15b::At1g78690 et *in vitro* sur les protéines purifiées et sur les préparations de membranes ont démontré l'activité NAPE synthase de la protéine At1g78690p. L'activité de ce gène n'a jusque là pas encore été étudiée *in planta*.

Les compositions lipidiques des plantes Col0 et ADN-T ont été déterminées. En théorie, les plantes KO (ADN-T) pour ce gène ne doivent plus produire cette enzyme et donc devraient contenir une quantité plus faible de NAPE que les plantes Col0.

Un extrait lipidique de chaque type de plante a été préparé en broyant des feuilles de la rosette dans une solution de chloroforme/méthanol (2:1 ; v/v). Une fois extraits (cf. « Matériels et Méthodes »), les lipides ont été séparés par CCM à l'aide d'un système de

solvants « Vitiello » et visualisés à l'aide d'un Image Quant après pulvérisation de primuline sur les plaques de chromatographie (figure IV-37).

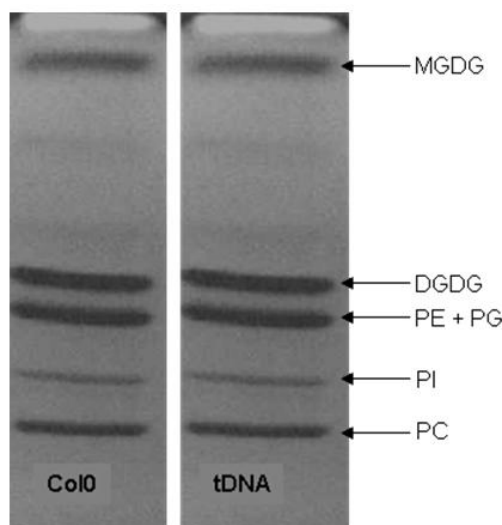


Figure IV-37. Analyse par CCM du profil lipidique des feuilles de la rosette des plantes Col0 et ADN-T pour le gène d'intérêt. Les lipides de feuilles après broyage du tissu à l'aide d'un potter verre/verre ont été extraits avec une solution de chloroforme/méthanol (2:1 ; v/v) comme décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les lipides totaux ont été déposés sur plaque CCM et séparés à l'aide d'un système de solvants polaires « Vitiello ». Les lipides ont été visualisés, après pulvérisation de primuline, avec un appareil Image Quant 300. DGDG, Digalactosyldiacylglycérol ; MGDG, Monogalactosyldiacylglycérol ; PC, Phosphatidylcholine ; PE, Phosphatidyléthanolamine ; PG, Phosphatidylglycérol ; PI, Phosphatidylinositol.

L'observation de ces plaques permet de visualiser les différents lipides endogènes des feuilles de la rosette d'*Arabidopsis thaliana*, à savoir PC, PI, PE, PG, DGDG et MGDG. Comme il est rappelé dans le tableau IV-3, ces lipides sont les lipides majoritaires des membranes de feuilles chez *A. thaliana*.

Lipid Class	Source of Lipid Extract				
	Leaves	Chloroplasts	Extrachloroplast	Roots	Seeds
PC	11.2	12	47.8	45.4	48.1
PE	10		36.5	27.5	22.1
PI + PS	6.4		10.9	12.9	18.9
SL	4.3	3.9			
DGD	20.2	20.9		2	3.3
PG	12	9.5	4.4	3.8	4.6
MGD	35.5	53.7		3.4	3
Total lipid mg/g F.W.	3.2	2.3	0.9	1.5	350

Tableau IV-3. Composition des glycérolipides membranaires en mol % dans différents organes et fractions subcellulaires chez *Arabidopsis thaliana*. DGD, Digalactosyldiacylglycérol ; MGD, Monogalactosyldiacylglycérol ; PC, Phosphatidylcholine ; PE, Phosphatidyléthanolamine ; PG, Phosphatidylglycérol ; PI, Phosphatidylinositol ; SL, Sulfoquinovosyldiacylglycérol. Les données sont exprimées en mol%. Données adaptées de Browse et Somerville (1994, 1991) et Bonaventure *et al.* (2003).

L'analyse de ces plaques CCM n'a pas permis d'observer la présence de NAPE chez les plantes Col0. L'analyse lipidique des racines de ces plantes n'a pas non plus permis de visualiser la présence de NAPE (non montrée). Ces résultats ne sont pas surprenants puisque comme indiqué dans la partie « Données Bibliographiques », les NAPE sont des lipides très minoritaires dans les différents tissus. En effet chez les plantes comme chez les animaux, ce lipide ne représente en générale que 0,01% des phospholipides totaux et la quantité de NAPE est souvent de l'ordre du pmol.g^{-1} de poids frais. La technique utilisée n'est donc pas assez sensible pour permettre la détection de ce phospholipide à partir d'un extrait de feuilles de la rosette de plantes Col0. Il est donc impossible *via* cette technique de mettre en évidence une diminution de ce lipide dans les plantes ADN-T. L'utilisation d'une méthode analytique plus sensible comme la spectrométrie de masse, en particulier l'ESI MS/MS couplé à des techniques de chromatographie en phase liquide (LC) pourrait permettre de mettre en évidence la présence de NAPE dans les plantes Col0 (Hansen *et al.*, 1999), et permettrait peut être de mettre en évidence une réduction de la quantité de ce lipide dans les plantes KO. Ces techniques pourront être développées prochainement à la plateforme de lipidomique de Bordeaux 2 grâce à l'acquisition d'un nouveau spectromètre de masse couplé avec une chaîne LC.

Comme l'absence de synthèse de NAPE chez les plantes ADN-T n'a pu être mise en évidence, pour confirmer *in planta* l'activité NAPE synthase de la protéine d'intérêt, nous avons choisi d'étudier, la composition lipidique de plantes surexprimant le transcrit de ce gène (expression sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur).

4.2 Transformation et sélection de plantes « 35S » pour le gène d'intérêt

L'étude de la composition lipidique de plantes surexprimant le transcrit du gène d'intérêt a nécessité la production de lignées d'*Arabidopsis thaliana* stables pour la construction 35S::At1g78690. Pour cela la séquence codante du gène d'intérêt a été introduite dans le vecteur pK7WG2D en aval du promoteur constitutif du virus de la mosaïque du chou-fleur (promoteur 35S, CaMV) situé dans la région d'insertion du plasmide (Clough et Bent., 1998). Puis, cette construction a été utilisée pour transformer *via Agrobacterium tumefaciens* des plantes d'*A.thaliana* par la méthode du « floral dipping » qui consiste à immerger les bourgeons floraux dans la solution d'agrobactéries. La région d'insertion située entre les séquences LB et RB du plasmide a été alors transférée dans le génome des plantes (figure III-6). Les graines issues des lignées ainsi traitées ont été sélectionnées sur milieu sélectif (contenant de la kanamycine) afin d'isoler les lignées transformées. 75% des premières graines issues de chaque lignée sélectionnée ont germé sur milieu MS complémenté à la kanamycine, signifiant que les différentes lignées « 35S »

sélectionnées ont une seule insertion du transgène par génome de plante (distribution 3/4 ; 1/4). Différentes plantes transgéniques (génération T2) ont été alors utilisées pour l'étude.

4.2.1 Mesure par RT-PCR quantitative du taux de transcrit du gène d'intérêt chez les plantes 35S::At1g78690.

Des expériences de RT-PCR quantitative ont été réalisées afin d'étudier le taux de transcrit du gène d'intérêt pour chaque lignée et de le comparer avec le taux de transcrit de ce même gène chez les plantes Col0 et ADN-T. Ces expériences ont permis de confirmer une quasi absence du transcrit du gène At1g78690 chez les plantes ADN-T (taux relatif = 0,05) en comparaison avec le taux du transcrit du gène chez des plantes Col0. Les résultats de RT-PCR des plantes « 35S » ont montré un taux de transcrit du gène d'intérêt de 70 à 85 fois supérieur à celui des plantes Col0 (figure IV-38). Ainsi, différentes lignées, dont les lignées 1-31, 43, 49 et 23, présentent une expression constitutive importante du transcrit du gène d'intérêt.

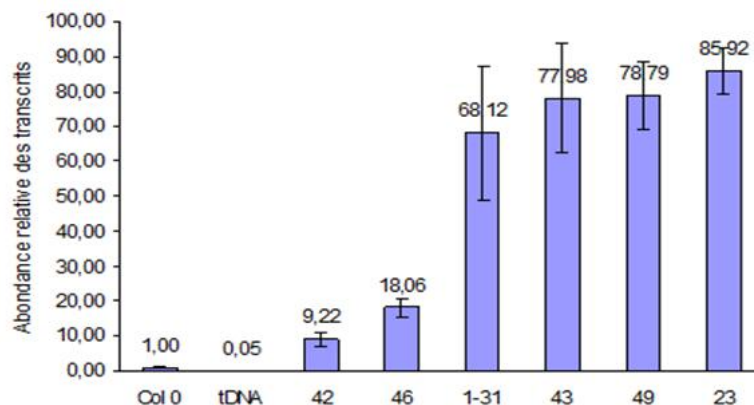


Figure IV-38. Abondance relative du transcrit du gène At1g78690 chez les plantes Col0, les plantes mutantes ADN-T et les plantes transformées par le plasmide pK7WG2D::At1g78690

Les ARN ont été extraits à l'aide du kit RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Les ADNc ont été synthétisés avec la reverse-transcriptase SuperScriptTM II RT (Invitrogen) suivi d'une digestion à la DNase I (DNA Free kit, AMBION). Les expériences de PCR quantitative ont été réalisées avec l'appareillage iCycler iQ (BIORAD) en utilisant du SYBR green® comme fluorophore. Les taux d'expression du gène ont été normalisés par rapport aux transcrits de l'actine 2 et d'EIF4-1. Les résultats représentent la valeur moyenne de 3 essais

4.2.2 Effet de la surexpression du gène d'intérêt sur la composition lipidique chez *A. thaliana* « 35S »

Les analyses par CCM d'un extrait lipidique de feuilles de plantes « 35S » ont permis d'observer la synthèse d'un lipide supplémentaire par rapport aux profils des plantes Col0 (figure IV-39). Ce lipide supplémentaire a un Rf de migration semblable à celui d'un standard commercial de NAPE.

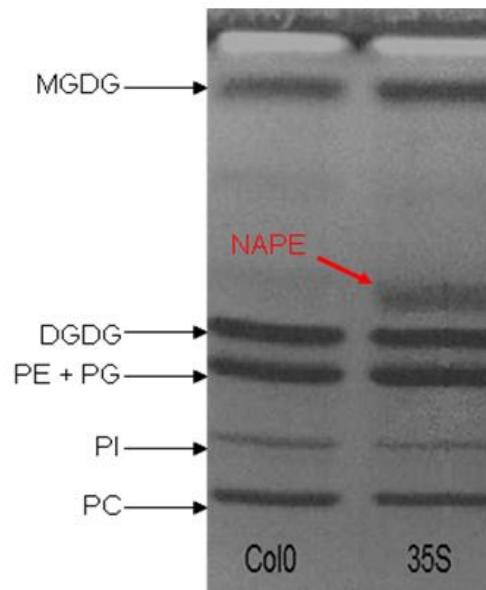


Figure IV-39. Analyse par CCM du profil lipidique de feuilles de la rosette chez des plantes Col0 et 35S::At1g78690.

Les lipides ont été extraits à partir d'un morceau de feuilles de la rosette, après broyage dans un potter à l'aide d'une solution de chloroforme/méthanol (2:1 ; v/v) (cf. « Matériels et Méthodes »). Les lipides totaux ont été déposés sur plaque CCM et séparés à l'aide d'un système de solvants polaires « Vitiello ». Les lipides ont été visualisés, après pulvérisation de primuline, avec un appareil Image Quant 300. DGDG, Digalactosyldiacylglycérol ; MGDG, Monogalactosyldiacylglycérol ; NAPE, N-acylphosphatidyléthanolamine ; PC, Phosphatidylcholine ; PE, Phosphatidyléthanolamine ; PG, Phosphatidylglycérol ; PI, Phosphatidylinositol.

Nous avons ensuite cherché à confirmer (et à préciser) la nature de ce lipide par des analyses en spectrométrie de masse.

4.2.3 Analyse par spectrométrie de masse de la NAPE synthétisée chez les plantes transgéniques 35S::At1g78690

Après avoir isolé par CCM et extrait de la silice le lipide observé uniquement chez les plantes surexprimant le gène At1g78690, une analyse par spectrométrie de masse ESI-MS/MS a été réalisée. Cette analyse a été réalisée à la plateforme de spectrométrie de masse de l'IECB. Ce lipide a été analysé par injection directe (« Shoot gun ») dans un spectromètre de masse (LCQ ADVANTAGE, Thermo Fisher®) couplé à une source ESI et à une trappe ionique (CID). Une fois récupérées, les données ont été analysées à l'aide du logiciel Xcalibur™. Le spectre de masse obtenu pour cet échantillon a permis d'identifier la présence d'un pic de masse 928 m/z. Après avoir isolé cet ion dans la trappe, sa fragmentation a été réalisée (figure IV-40). Parmi les fragments obtenus, on note la présence de l'ion 256 m/z correspondant à la forme anionique de l'acide palmitique, l'ion 672 m/z correspondant à la forme neutre de la molécule de NAPE à laquelle un acide palmitique a été soustrait. Chez les NAPE, la fragmentation des formes neutres de la molécule,

correspondant à de la lyso-NAPE, se poursuit par la perte de l'acide gras en position amine avec le groupement éthanolamine (NAE). Suite à ce processus, il est possible d'observer dans nos échantillons, la présence de l'ion à 391 m/z (forme neutre associée à l'acide palmitique plus le squelette glycérol). De plus, la masse de 255 m/z est dans le spectre la seule à correspondre à un acide gras. Le squelette glycérol apparaît donc uniquement estérifié par de l'acide palmitique en *sn1* et *sn2*. Pour obtenir au final une masse de 928 m/z, il faut avoir également un acide palmitique en position amine de la molécule. Ainsi le composé correspondant au lipide « supplémentaire » dans les plantes « 35S », lipide dont la masse est égale à 928 m/z, a été identifié lors de cette analyse comme étant du N-palmitique-1-palmitique-2-palmitique-phosphatidyléthanolamine (figure IV-40).

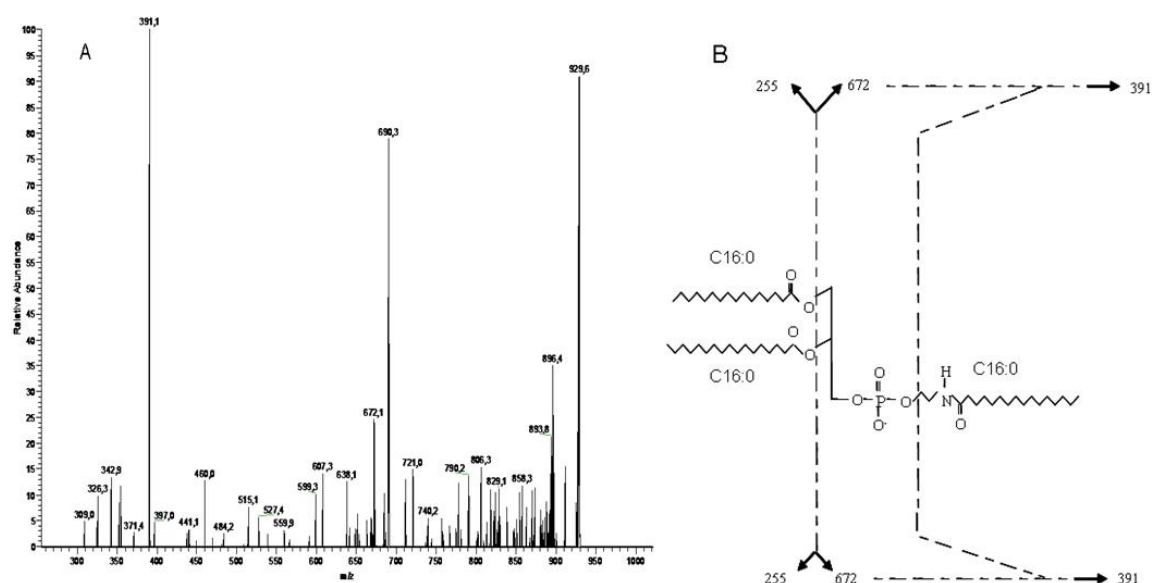


Figure IV-40. Spectre MS/MS en mode négatif et profil de fragmentation de l'espèce moléculaire à 928 m/z.

A, Spectre MS/MS en mode négatif de l'ion 928 m/z ; B, Profil de fragmentation du N-palmitique-1-palmitique-2-palmitique-phosphatidyléthanolamine.

Un seul pic correspondant à une seule variété de NAPE a été déterminé lors de ces premiers tests. Cependant il est très probable que d'autres variétés de NAPE soient présentes dans cet échantillon. Une ionisation sélective de ce composé empêche peut être d'observer la présence des autres formes de NAPE présentes chez les mutants « 35S ». Un travail d'optimisation de cette méthode d'analyses devra être réalisé afin d'isoler les différentes formes de NAPE en fonction de la taille des chaînes carbonées qui compose ces lipides, (couplage avec une chromatographie en phase liquide). Cette technique permettrait d'éviter l'ionisation sélective du N-palmitique-1-palmitique-2-palmitique-phosphatidyléthanolamine lors de ces analyses, mais aussi de diminuer le bruit de fond observé durant ces expériences.

Comme nous l'avons vu dans la partie « Données Bibliographiques », les NAPE sont des lipides précurseurs des N-acyléthanolamines (NAE), lipide médiateur intervenant dans de nombreux processus cellulaires. L'analyse des profils de migration obtenus (figure IV-39) ne semble pas indiquer une augmentation de la synthèse de NAE chez les plantes 35S::At1g78690. Les plantes surexprimant le transcrit du gène d'intérêt accumulent donc la NAPE sans pour autant la dégrader en NAE. Ainsi l'hydrolyse des NAPE catalysée par les PLD semble être l'étape limitante dans la voie de synthèse des NAE chez les plantes. Ceci est en accord avec les observations faites chez les animaux où la voie NAPE-PLD est considérée comme l'étape limitante de la formation de NAE (Fezza et *al.*, 2004).

En résumé, les analyses de la composition lipidique des plantes « 35S » et Col0 ont permis d'observer la présence d'un lipide supplémentaire dans différentes lignées surexprimant le gène At1g78690. Ce lipide a été identifié comme étant de la N-acylphosphatidyléthanolamine (NAPE) par spectrométrie de masse. Ces résultats permettent donc de confirmer *in planta* l'activité NAPE synthase de la protéine At1g78690p chez *A. thaliana*.

La protéine At1g78690p, identifiée par homologie de séquence avec la protéine de levure YPR140Wp, est donc la première N-acylphosphatidyléthanolamine synthase caractérisée.

4.3 Analyse de l'activité promotrice du gène At1g78690

L'activité du promoteur du gène At1g78690 a été analysée au moyen d'une stratégie de gène rapporteur GUS (β -glucuronidase). Le gène GUS étant sous le contrôle du promoteur du gène d'intérêt, l'activité β -glucuronidase mesurée reflète indirectement l'activité du promoteur et permet d'étudier son expression chez des plantes transgéniques.

Cette étude nécessite la production de lignées d'*Arabidopsis thaliana* stables pour la construction « promoteur du gène At1g78690::séquence codante de la β -glucuronidase » (PAt1g78690::GUS). La région de 1000pb en amont du codon méthionine initiateur de la protéine d'intérêt a été introduite dans le vecteur pKGWFS7 et a été fusionnée avec la séquence codante de la β -glucuronidase. Cette construction a été utilisée pour transformer des plantes d'*Arabidopsis thaliana* via *A. tumefaciens* par la méthode du « floral dipping » décrite dans la partie « Matériels et Méthodes ».

L'analyse de l'activité β -glucuronidase a été réalisée par marquage histochimique des tissus végétaux de la descendance (génération T2) de différentes lignées sélectionnées pour le transgène : PAt1g78690::GUS (cf. « Matériels et Méthodes »). La β -glucuronidase est capable d'hydrolyser du X-Gluc, ce qui produit un précipité bleu. Les observations de cette

activité dans les tissus de plantes ont été faites sur plusieurs lignées et sur différents tissus à différents stades de développement de la plante (figure IV-41).

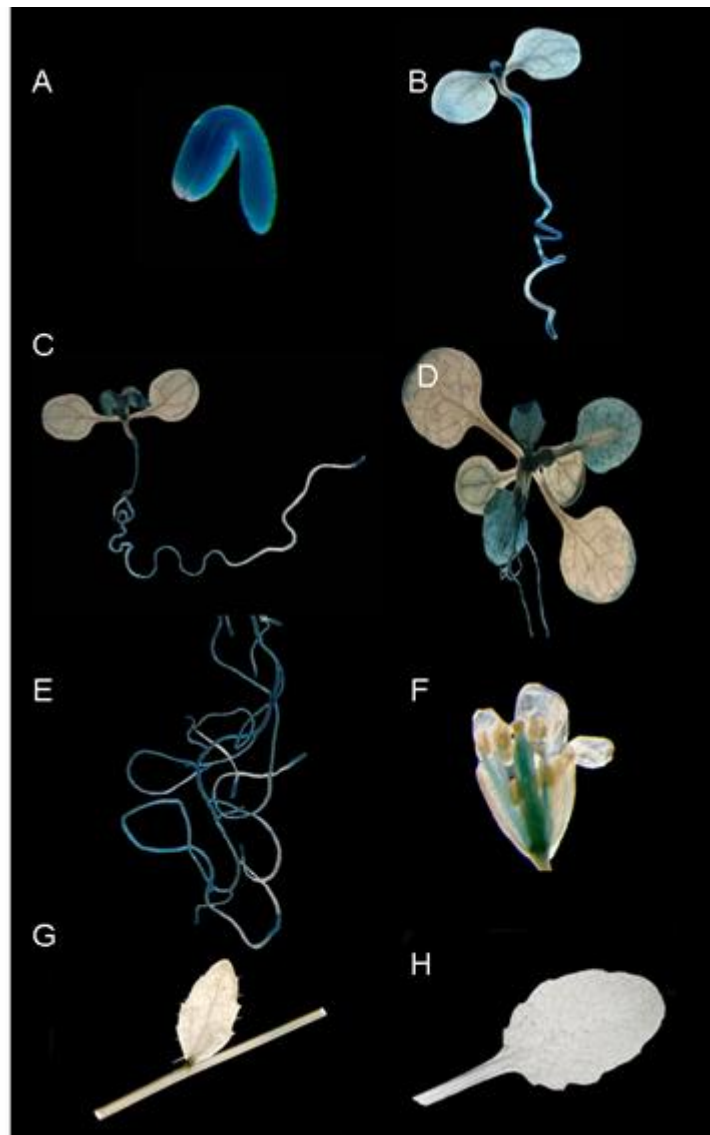


Figure IV-41. Localisation tissulaire de l'activité du promoteur du gène At1g78690 dans les lignées d'*A. thaliana* transgéniques.

Les tissus de plantes transformées avec le plasmide contenant la construction PAT1g78690::GUS ont été colorés pendant plusieurs heures puis observés avec un stéréomicroscope LEICA MZ FL III équipé d'une caméra numérique LEICA (modèle DC 300F). (A), embryon 1 jour après imbibition. (B), plantule de 3 jours. (C), plantule de 6 jours. (D), rosette de plante de 15 jours. (E), racine de plante de 15 jours. (F), fleur. (G), Feuille caulinaire et tige. (H), feuille âgée de la rosette (>20 jours)

Le promoteur du gène At1g78690 apparaît actif dans plusieurs tissus comme les cotylédons, les feuilles de la rosette, les racines, les fleurs et l'embryon. Une activité du promoteur du gène d'intérêt a été notamment détectée au niveau des jeunes feuilles de la rosette chez des plantes de 6 jours (figure IV-41 C), mais cette activité diminue progressivement dans ces tissus au cours de leur développement (figure IV-41 D). L'activité

du promoteur a été également observée au stade embryonnaire (figure IV-41 A). Pour les fleurs, la coloration GUS a été visualisée plus précisément au niveau du filet des étamines ainsi qu'au niveau du style (figure IV-41 F).

L'activité la plus importante du promoteur de ce gène, et qui perdure au cours de la croissance de la plante, a été observée au niveau des racines principales et secondaires (figure IV-41 E). Comme nous l'avons vu précédemment, les NAPE sont les précurseurs des NAE qui sont des lipides impliqués dans le développement racinaire (Sandoval *et al.*, 2002). Pour rappel, l'application de NAE-12:0 est responsable d'une diminution de la taille des racines *via* une désorganisation du cytosquelette des cellules. Il est donc intéressant de noter que l'activité du promoteur du gène codant pour l'enzyme responsable de la synthèse de NAPE soit retrouvée dans ces tissus.

4.4 Etude de la localisation subcellulaire de la protéine At1g78690p

Les analyses bioinformatiques concernant la localisation de la protéine d'intérêt décrites dans les paragraphes 1.2.3 et 1.2.4 ne permettent pas de proposer une localisation cellulaire pour At1g78690p. Effectivement, même si 2 segments transmembranaires ont été identifiés par 2 programmes différents (« Phobius prédiction », « TM pred »), leurs probabilités de présence restent très faibles. De plus, d'autres logiciels comme « HMMTOP », « TMHMM », et « PSORTII », ne mentionnent aucun segment transmembranaire, ni peptide signal permettant de proposer une localisation subcellulaire de la protéine At1g78690p. L'activité NAPE synthase de la protéine At1g78690p est cependant retrouvée au niveau des membranes d'*E. coli* transformées par le plasmide pET-15b::At1g78690 (cf. paragraphe 3.4).

Nous avons donc entrepris d'étudier la localisation cellulaire/subcellulaire de la protéine d'intérêt par analyse en microscopie confocale de la protéine de fusion At1g78690-EYFP (fusion en N^{ter} et C^{ter}). Pour cela la séquence codante de la protéine candidate a été introduite dans deux vecteurs (pK7WGY2 et pK7YWG2 cf. « Matériels et Méthodes ») permettant de « fusionner » à son extrémité en N- ou C-terminal avec la séquence codante de la protéine EYFP. Ces constructions ont été utilisées pour transformer de façon transitoire des cellules épidermiques de feuilles de tabac *via A. tumefaciens* (GV3101) par agro-infiltration (cf. « Matériels et Méthodes »). Il est ensuite possible de visualiser rapidement (24 à 48 heures après la transformation des tabacs) la localisation subcellulaire de la protéine d'intérêt. Les observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope confocale (Leica TCS SP2) sous excitation à 514nm (fenêtre de détection entre 530 et 550).

Des co-expressions avec des marqueurs spécifiques ont également été réalisées afin de confirmer la localisation de la protéine d'intérêt. Pour cela la protéine PMA4, H⁺ATPase

de *Nicotiana plumbaginifolia*, fusionnée avec la protéine EGFP a été utilisée comme marqueur des membranes plasmiques. Les observations ont été effectuées sous excitation à 488nm (fenêtre de détection 490 à 500nm).

Ces analyses ont permis de mettre en évidence la localisation de la protéine au niveau des membranes plasmiques des cellules. Aucune autre localisation n'a été observée pour cette protéine (figure IV-42) et cela dans n'importe quel plan z de la cellule (le plan z représentant le plan en profondeur).

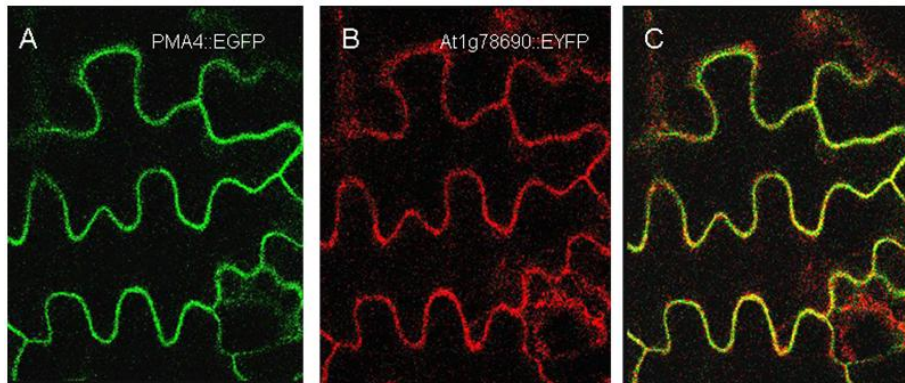


Figure IV-42. Expression de la protéine At1g78690p fusionnée à l'EYFP dans les cellules épidermiques de feuille de tabac.

Les observations ont été effectuées sous microscope confocal à 488 nm pour la protéine PMA4::EGFP et à 514 nm pour la protéine At1g78690::EYFP. A, cellules épidermiques de tabac exprimant transitoirement la protéine PMA4::EGFP ; B, cellules épidermiques de tabac exprimant transitoirement la protéine At1g78690::EYFP ; C, superposition des images A et B.

D'après les travaux réalisés par Chapman et Sriperameswaran (1997), l'activité NAPE synthase, correspondant à l'acylation de la PE par un acide gras libre serait essentiellement localisée au niveau des membranes du RE. Cependant d'après leurs résultats, il n'est pas à exclure qu'une faible quantité de ce lipide soit synthétisé également dans les membranes golgiennes et plasmiques. Les auteurs ont envisagé que cette faible activité mesurée dans le plasmalemm et le golgi puisse résulter d'une contamination de ces fractions par le RE (Chapman et Sriperameswaran, 1997). Suite à notre découverte de l'activité NAPE synthase acyl-CoA-dépendante de la protéine At1g78690p, nous proposons qu'il puisse exister une voie de synthèse de NAPE utilisant les acyl-CoA comme substrats chez les plantes et localisée exclusivement au niveau des membranes plasmiques des cellules.

4.5 Analyses phénotypiques des plantes ADN-T (Salk 029716) pour le gène d'intérêt

Puisque nous avons montré que le taux de transcrit du gène d'intérêt était quasi nul dans la lignée ADN-T (paragraphe 4.1.1), nous avons recherché un phénotype chez ces

plantes bien qu'aucune différence de composition lipidique n'ait été observée entre les mutants ADN-T et la lignée Col0 (paragraphe 4.1.2).

Un phénotype racinaire et de germination des graines chez ces plantes ADN-T a été plus particulièrement recherché pour plusieurs raisons. Tout d'abord, nous avons vu que le promoteur de la NAPE synthase est très actif dans les racines (test « GUS ») et dans l'embryon. De plus, il est connu que l'application de NAE exogènes (NAE-12:0) dans le milieu de culture des plantes induit une diminution de la taille des racines principales, du chevelu racinaire et du nombre de racines secondaires (Blancaflor *et al.*, 2003). Il a donc été supposé que si l'application de NAE entraînait une diminution de la taille des racines, alors l'absence de synthèse de NAPE (lipide précurseur des NAE) chez les plantes ADN-T pourrait s'accompagner d'une augmentation de la taille des racines. Enfin, nous avons vu dans la partie « Données Bibliographiques » que la quantité de NAPE et de NAE est doublée au moment de l'imbibition des graines puis chute rapidement 4 heures après cette hydratation. Il a donc été proposé que ces lipides soient impliqués dans la germination (Wang *et al.*, 2006).

Des graines de plantes Col0 ainsi que de graines de plantes ADN-T ont été semées dans des boîtes de Pétri (10x10cm) placées en position verticale. La proportion de graines en germination a été mesurée entre ces deux lignées en fonction du temps. Une graine est considérée en germination à partir du moment où la radicule sort de son tégument et continue ensuite son développement. Sur cette base, aucune différence n'a été observée entre les deux lignées. De plus, les racines principales de ces deux lignées ont été mesurées tous les deux jours. Aucune différence significative n'a été observée entre les plantes ADN-T et les plantes Col0. La figure IV-43 représente la taille des racines principales de jeunes plantules à 15 jours de culture.

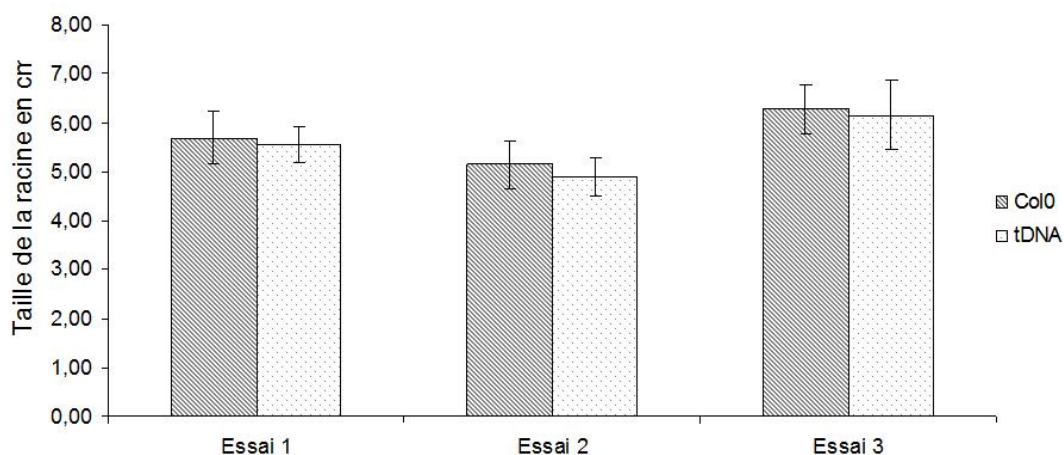


Figure IV-43. Effet du taux de transcrit sur la taille des racines principales entre les plantules Col0 et ADN-T. Les expériences ont été renouvelées 3 fois, les résultats indiqués correspondent à la taille des racines à 15 jours.

L'absence des transcrits du gène At1g78690 est semble-t-il sans effet sur le taux de germination des graines des plantes ADN-T et sur le développement des racines principales. Plusieurs explication peuvent être avancées pour expliquer cette absence de phénotype : (i) chez les plantes sauvages, les quantités de NAPE et NAE sont négligeables dans les conditions standards, l'absence de NAPE synthase chez les mutants ADN-T n'entraînerait donc aucun phénotype visible ; (ii) la deuxième voie possible de synthèse des NAPE, celle utilisant les acides gras libres (Chapman *et al.*, 1993), permettrait de maintenir la quantité nécessaire de ces lipides pour assurer le développement des plantes (figure IV-44).

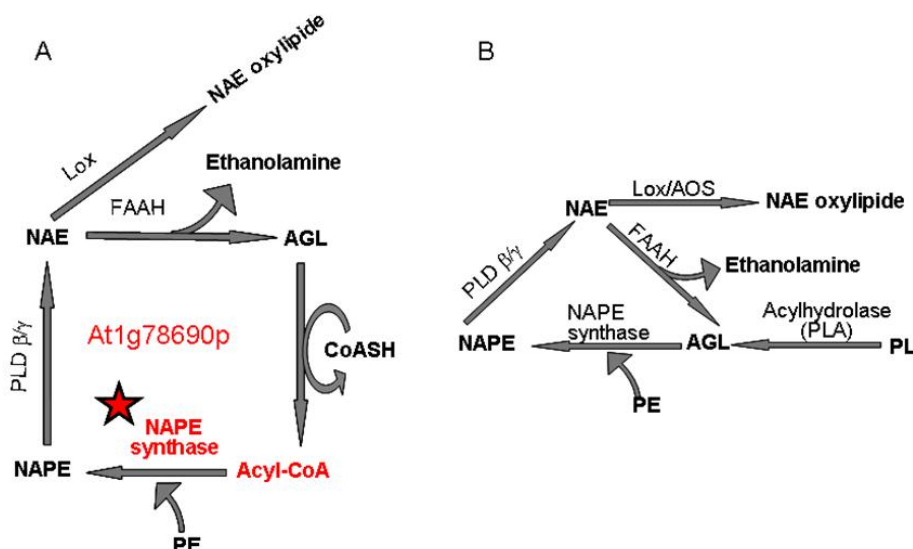


Figure IV-44. Représentations schématiques des deux voies du métabolisme des NAPE présentes chez les plantes.

A, voie de synthèse des NAPE via l'acylation de la PE avec un acyl-CoA (Faure *et al.*, 2009) ; B, voie de synthèse des NAPE via l'acylation de la PE avec un acide gras libre (Chapman *et al.*, 1993a). AGL, acide gras libre ; CoASH, Coenzyme A ; FAAH, fatty acid amide hydrolase ; Lox, lipoxygénase ; NAE, N-acyléthanolamine ; NAPE, N-acylphosphatidyléthanolamine, PE, phosphatidyléthanolamine ; PL, phospholipide ; PLD, phospholipase D.

4.6 Analyses phénotypiques des plantes « 35S » pour le gène d'intérêt

Les graines des plantes 25-2-5, 29-2-3, 31-2-1 (génération T-3) ont été semées sur milieu MS complémenté à la kanamycine ($75\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Plus de 90% de ces graines germent, et aucune des plantules obtenues ne blanchit sous l'effet de l'antibiotique. Ainsi les graines de ces différentes lignées sont issues de plantes homozygotes pour la construction 35S::At1g78690. Cependant 70% de ces plantules présentent au bout de 3-4 jours de culture un arrêt dans leur développement. Ces plantules prennent un aspect « vitreux » et finissent par mourir après une dizaine de jours de culture. Le même résultat est obtenu lorsque ces graines sont cultivées sur milieu MS (sans kanamycine). Les 30% des plantules restantes ont un développement « normal » sur milieu MS (figure IV-45).

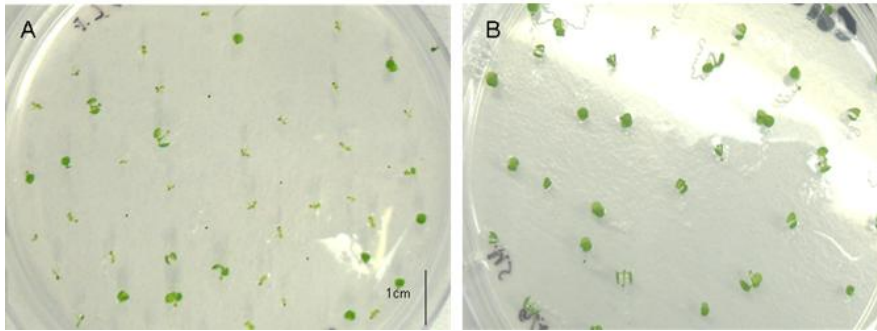


Figure IV-45. Image de culture de plante de la lignée (T3) 31-2-1 et Col0 sur milieu MS.
A, plantule 31-2-1, B, plantule Col0.

De nouvelles cultures ont été réalisées avec un milieu différent de celui utilisé précédemment, il s'agit d'un milieu MS complété avec du saccharose à 10g.l^{-1} . D'une façon générale, il est possible de noter que le sucre a un effet sur le développement des plantes en accélérant de façon très modérée leur développement comme nous avons pu l'observer à partir de cultures de plantules Col0 (figure IV-46).

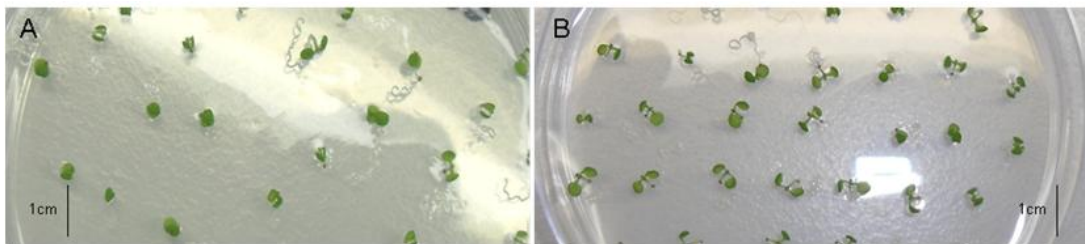


Figure IV-46. Effet du saccharose sur le développement de plantes Col0.
A, plantules Col0 sur milieu MS (MES $0,5\text{g.l}^{-1}$; agar 7g.l^{-1} , pH 5,8) ; B, plantules Col0 sur milieu MS (MES $0,5\text{g.l}^{-1}$; agar 7g.l^{-1} , pH 5,8) avec 10g.l^{-1} de saccharose.

Les résultats montrent que sur ce milieu enrichi en saccharose, plus de 90% des plantules des lignées 25-2-1, 29-2-1, 31-2-1 germent et se développent normalement en comparaison avec ces mêmes graines sur milieu MS seul (figure IV-47).

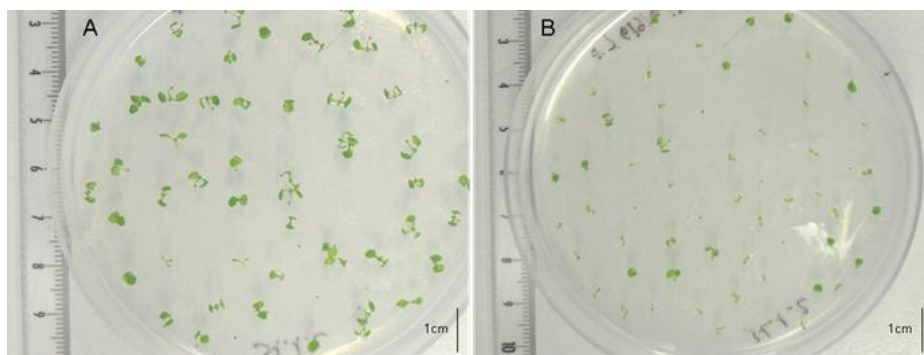


Figure IV-47. Effet du saccharose sur le développement de plantes surexprimant le gène At1g78690.
Plantules de la lignée 31-2-1 sur milieu MS (MES $0,5\text{g.l}^{-1}$; agar 7g.l^{-1} , pH 5,8) en présence de 10g.l^{-1} saccharose (A), ou en absence de saccharose (B).

Le phénotype observé à partir des graines de lignées homozygotes pour la construction 35S::At1g78690 ressemble à celui observé chez les mutants « sucre dépendant » (sdp) dont les plantes sdp1, décrit par Eastmond en 2006, qui présentent un déficit pour l'activité lipase nécessaire à la dégradation des TAG. Cette dégradation permet de fournir un pool d'acides gras libres nécessaire au processus de germination des plantules (Eastmond, 2006). Ainsi il est supposé que la surexpression du transcrit du gène At1g78690 chez les plantes d'*A. thaliana* soit responsable notamment d'une diminution de la quantité des lipides de réserve présente dans les graines. En bon accord les premières analyses par chromatographie en phase gazeuse (CPG) ont montré que la quantité d'acides gras totale présente dans les graines de différentes lignées « 35S » (25-2-5, 29-2-3, 31-2-1) semblent plus faible que les plantes Col0 (figure IV-48).

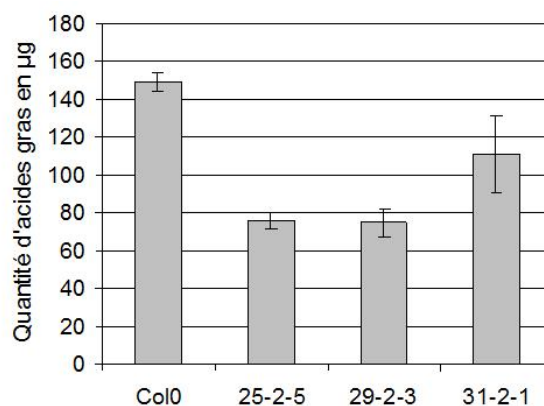


Figure IV-48. Effets de la surexpression du transcrit du gène At1g78690 chez différentes lignées (25-2-5, 29-2-3, 31-2-1) sur la quantité d'acides gras mesurée à partir de 20 graines de chaque lignée. Les résultats représentent la valeur moyenne de 3 analyses.

Cependant il ne s'agit que de résultats préliminaires et des expériences complémentaires sont nécessaires avant de conclure sur l'effet de la surexpression du transcrit du gène At1g78690 sur la diminution des lipides de réserve présents dans les graines.

D'autres expériences sont aussi planifiées pour étudier notamment le développement racinaire des lignées surexprimant le gène At1g78690.

En résumé, nous avons observé une activité du promoteur du gène notamment au niveau des tissus jeunes de la plantes et des racines.

L'analyse de cultures de plantes ADN-T et Col0 n'a pas permis d'observer d'effet de la perte du transcrit du gène sur la germination des plantules, ni sur le développement des racines. En revanche la surexpression du gène affecte le développement des jeunes plantules en arrêtant leur développement deux à trois jours après leur germination. Ce phénotype peut être complémenté par ajout de saccharose dans le milieu de culture des plantes.

PARTIE V

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Discussion générale et perspectives

Durant cette thèse, nous avons caractérisé tout règne confondu la première NAPE-synthase : At1g78690p en montrant que cette protéine décrite comme une acyltransférase putative dans la base de données du TAIR catalyse *in vivo* et *in vitro* la synthèse de NAPE. Ces NAPE correspondent à la forme acylée de la PE sur sa fonction amine, et sont les précurseurs des NAE, lipides médiateurs impliqués dans de nombreuses voies de signalisation (cf. « Données Bibliographiques »). Cette N-acylation sur la tête polaire d'un phospholipide a été mise en évidence depuis plusieurs années, cependant peu d'informations sont disponibles permettant de comprendre comment une protéine est capable de catalyser une telle réaction. La caractérisation d'At1g78690p constitue donc une étape importante dans la compréhension de ce type de réaction.

Chez les plantes, la synthèse de NAPE a surtout été étudiée depuis les années 90 par l'équipe de K. D. Chapman qui a montré que dans les microsomes de coton, cette synthèse résulte de l'acylation Ca^{2+} indépendante d'une PE par un acide gras libre. Nous avons montré lors de cette thèse que chez *Arabidopsis thaliana*, la NAPE-synthase codée par le gène At1g78690 peut *in vitro* acyler une PE avec un acyl-CoA, mais en aucun cas avec un acide gras libre. De nouveaux tests sont à prévoir afin de déterminer si la protéine At1g78690p peut utiliser d'autres donneurs d'acyles comme des phospholipides pour la synthèse de NAPE. En effet chez les animaux, cette synthèse résulte d'une transacylation entre une chaîne acyle en position *sn1* d'une PC et la fonction amine d'une PE.

A plus long terme, la caractérisation de l'enzyme At1g78690p pourrait se poursuivre par l'identification du site catalytique de l'enzyme et des sites de fixation de ses substrats (PE, acyl-CoA, etc.). Ces analyses pourront être effectuées en produisant des protéines tronquées puis en mesurant leur activité de synthèse de NAPE. Cette étude permettra de confirmer ou d'identifier de nouveaux domaines protéiques importants pour l'activité enzymatique de la protéine At1g78690p. Les motifs caractéristiques des acyltransférases à domaine « plsC » seront étudiés en tout premier lieu. L'identification de nouveaux domaines permettrait également de rechercher de nouvelles séquences protéiques pouvant catalyser la synthèse de NAPE chez les plantes et les animaux. Par ailleurs, des mutations ponctuelles pourront préciser les acides aminés impliqués dans la fixation des substrats ou dans la réaction proprement dite. Enfin, toujours dans le but de mieux comprendre le fonctionnement de cette N-acyl-transférase, la structure tridimensionnelle de l'enzyme

pourrait être déterminée. Cela nécessiterait la production d'une quantité importante de la protéine purifiée pour la réalisation de cristaux avant de les analyser par diffraction aux rayons X. La connaissance de la structure tertiaire de l'enzyme permettrait par exemple de modéliser son fonctionnement et de mieux comprendre de quelle façon cette protéine est associée aux membranes plasmiques des cellules.

Chez les plantes comme chez les animaux, la synthèse de NAPE est catalysée par une (ou des) enzyme(s) membranaire(s). Chez le coton par exemple, elle semble être exclusivement associée aux membranes du RE. Les analyses bioinformatiques et les expériences de localisation de la protéine de fusion At1g78690::EYFP ont montré que la protéine d'intérêt est localisée au niveau de la membrane plasmique des cellules. Si cette protéine est effectivement impliquée dans la synthèse de NAPE lors de différents stress, elle pourrait être localisée plus particulièrement au niveau des radeaux lipidiques qui sont de véritables plateformes de signalisation présents dans les membranes plasmiques des cellules appelés également DIM pour « Detergent Insoluble Membrane » (Simons et Ikonen, 1997 ; Bhat et Panstruga, 2005). Cette localisation est d'autant plus probable qu'il a été montré que le métabolisme des NAPE est augmenté dans les DIM chez les animaux lors de stress (McFarland *et al.*, 2006). La localisation de cette protéine chez les plantes pourra être effectuée grâce à des techniques d'immunomarquage à l'aide des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine At1g78690p (anticorps obtenus au cours de cette thèse, cf. « Résultats et Discussions » paragraphe 3.2.2).

Plusieurs voies de synthèse de NAPE pourraient donc coexister chez les plantes : une voie « acide gras libre-dépendante » essentiellement localisée dans le RE (Chapman *et al.*, 1993) et une voie « acyl-CoA-dépendante » au niveau de la membrane plasmique (Faure *et al.*, 2009). Comme nous avons pu l'observer dans la partie « Résultats », l'absence de transcrit de la protéine At1g78690p chez les plantes ADN-T ne s'accompagne d'aucun phénotype en conditions « normales » de culture. Il a été supposé que la quantité de NAPE et de NAE chez les plantes Col0 est tellement faible que l'absence de la protéine At1g78690p chez les mutants ADN-T n'entraîne aucun effet visible. Il est également possible que dans ces conditions « normales » de culture, la voie « acide gras libre-dépendante » assure chez ces plantes ADN-T la quantité minimale de NAPE nécessaire pour le bon développement des plantes. La voie « acyl-CoA-dépendante » pourrait avoir une importance prépondérante lors de différents stress. Nous avons vu dans la partie « Données Bibliographiques » que lors d'attaques pathogènes, il y a augmentation de la quantité de NAPE et de NAE ainsi qu'une concentration cytosolique plus importante en Ca^{2+} (Lecourieux *et al.*, 2006). Le Ca^{2+} est connu pour activer la transcription de gènes de défense comme la

PAL (Lecourieux *et al.*, 2006). Il peut être supposé que le Ca^{2+} intervienne dans l'activation de ce gène en favorisant la synthèse de NAPE. En effet, il est connu que la synthèse de ces lipides chez les animaux est Ca^{2+} -dépendante (Natarajan *et al.*, 1982 ; Schmid *et al.*, 1990) et l'on sait par ailleurs que les NAE (métabolites des NAPE) sont capables d'activer la transcription du gène PAL (Tripathy *et al.*, 1999). Pour explorer plus avant les relations entre le Ca^{2+} et la synthèse de NAPE « acyl-CoA-dépendante » chez *A. thaliana*, on peut envisager de réaliser des études complémentaires avec la protéine At1g78690p purifiée en présence ou en absence de Ca^{2+} .

Comme nous l'avons vu, les NAPE sont les précurseurs des NAE qui sont des lipides impliqués dans de nombreux processus cellulaires dont la germination des graines, le développement racinaire ou encore la mise en place de réponses des plantes contre des attaques pathogènes. Comme nous venons de le voir, nous avons supposé que lors d'attaques pathogènes la protéine At1g78690p puisse être responsable de l'augmentation de la quantité des NAPE nécessaires à la synthèse des NAE. Au moins deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette augmentation en présence d'un éliciteur comme la xylanase. Première hypothèse, l'interaction de la xylanase avec un récepteur présent en surface des cellules pourrait être responsable de l'activation de la transcription du gène At1g78690, permettant ainsi d'augmenter la quantité de la protéine d'intérêt au niveau de la membrane plasmique. Cette augmentation de NAPE-synthase permettrait de produire une quantité plus élevée de NAPE nécessaire à la synthèse des NAE déclenchant ainsi les voies de défense des plantes (figure V-1). La réalisation d'expériences de RT-PCR quantitative permettrait de valider cette hypothèse en comparant le taux d'expression du gène d'intérêt dans des cellules de tabac en présence ou non d'un éliciteur.

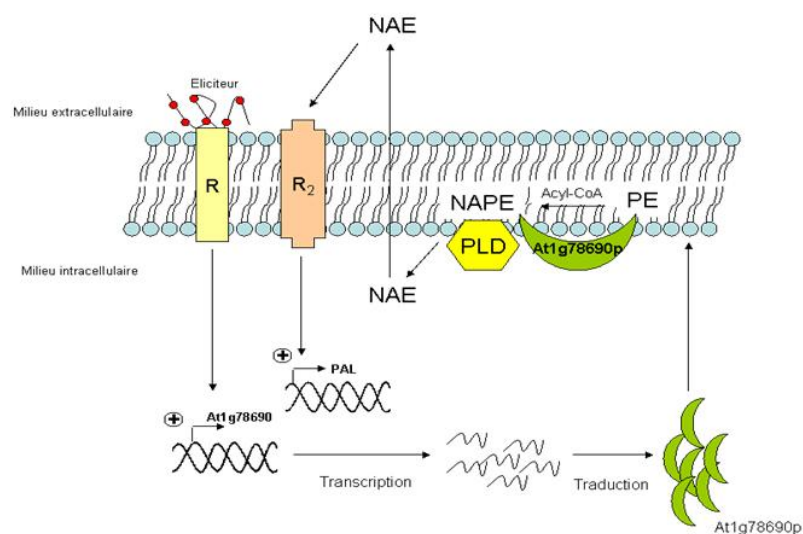


Figure V-1. Hypothèse d'activation de la transcription du gène At1g78690 en présence d'un éliciteur comme la xylanase.

R, récepteur ; NAPE, N-acylphosphatidylethanolamine ; NAE, N-acyléthanolamine ; PLD, Phospholipase D.

Deuxième hypothèse, si la NAPE synthase est effectivement localisée au niveau des radeaux lipidiques, il peut être supposé, comme cela a été proposé chez l'animal (McFarland *et al.*, 2006), qu'un recrutement des PLD s'opère dans ces microdomaines lors de différents stress afin de cliver les NAPE en NAE (figure V-2). Cette hypothèse pourrait être validée en comparant l'activité spécifique des PLD entre les radeaux lipidiques et le reste de la membrane plasmique de cellules BY2 traitées ou non à la xylanase.

Il est également envisageable que ces deux hypothèses soient combinées pour expliquer l'augmentation de synthèse de NAPE en présence de xylanase dans des cellules BY2 (augmentation du taux de transcrit d'At1g78690 et recrutement des PLD dans les radeaux lipidiques).

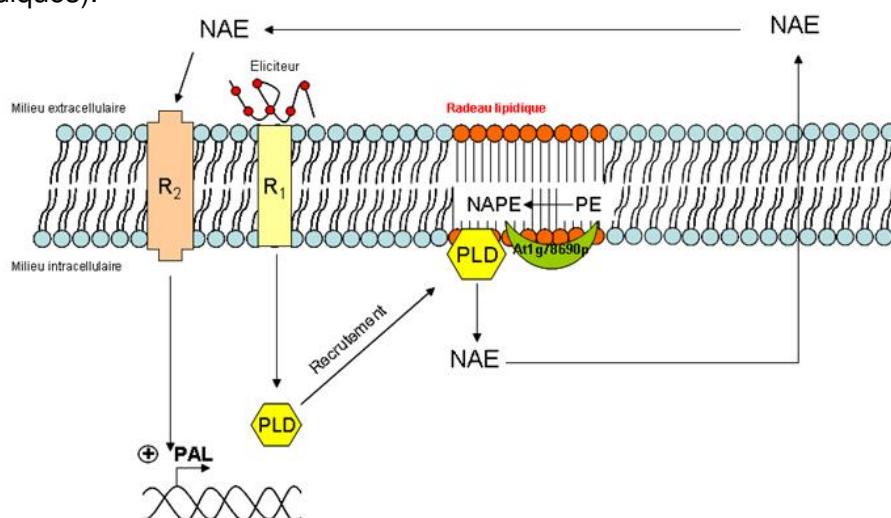


Figure V-2. Représentation hypothétique de l'activation de la NAPE synthase (At1g78690p) dans les voies de réponses des plantes en présence d'éliciteur.

NAE, N-acyléthanolamine ; NAPE, N-acylphosphatidyléthanolamine ; PAL, Phénylalanine ammonia-lyase ; PE, Phosphatidyléthanolamine ; PLD, Phospholipase D ; R_{1/2}, Récepteur 1 et 2.

Bien que le gène At1g78690 soit fortement exprimé dans les racines (comme nous l'avons montré à l'aide de tests GUS), aucun phénotype racinaire dans des conditions « normales » de culture n'a été observé chez les plantes ADN-T (tailles de la racine principale, des racines secondaires et du chevelu racinaire). De plus, le taux de germination et le développement des jeunes plantules sont identiques entre les lignées Col0 et ADN-T. Il a été supposé que dans ces conditions, la quantité de NAPE et NAE chez les plantes Col0 est si faible que l'absence de la protéine At1g78690p chez les mutants ADN-T n'entraîne aucun effet visible. En revanche, l'étude des plantes surexprimant ce gène a permis d'observer un phénotype de type « sugar dépendant ». Effectivement, en absence de saccharose, ces plantules provenant de plantes homozygotes pour la construction 35S::At1g78690 stoppent leur développement 3 jours après germination. Ce phénomène n'est pas observé en présence de saccharose. Il existe de nombreux mutants pour lesquels le développement des plantules est arrêté quelques jours après leur germination ou

fortement ralenti comme le mutant *wir1* (Cernac *et al.*, 2006) impliqué dans le contrôle de la glycolyse, le mutant *pkp1* défectueux pour une pyruvate kinase (Andre *et al.*, 2007), les mutants *sdp1*, *sdp2* (*mdar4*), *sdp6* (*fad-gpdh*) qui ne peuvent métaboliser les TAG en sucres indispensables à la germination (Eastmond, 2006 ; 2007 ; Quettier *et al.*, 2008) tout comme les mutants *kat2* et *ped1* (Germain *et al.*, 2001. Hayashi *et al.*, 1998). Les causes de l'arrêt du développement de ces mutants sont variées: diminution de la synthèse des triacylglycérols (TAG, lipides de réserve des graines), inhibition de la dégradation des TAG, inhibition de la néoglucogenèse, arrêt du transport des lipides de réserve etc. L'ajout de sucre dans le milieu de culture de ces mutants permet de restaurer le développement des jeunes plantules. L'acide abscissique (ABA) est également impliqué dans le développement des jeunes plantules (Debeaujon et Koornneef, 2000 ; Pritchard *et al.*, 2002 ; Penfield *et al.*, 2006 ; Holdsworth *et al.*, 2008 ; Xing *et al.*, 2009). En effet, cette phytohormone peut par exemple diminuer le taux de transcription des gènes de la β -oxydation et du cycle du glyoxylate qui sont deux voies métaboliques essentielles pour la conversion des lipides de réserve en sucres. L'ajout de certaines concentrations de sucre peut lever l'inhibition de l'ABA sur le développement des jeunes plantules (Finkelstein et Gibson, 2001 ; Pritchard *et al.*, 2002). Le facteur de transcription ABI3 est impliqué dans la régulation de ces processus. Peu de temps après la germination, la quantité de ce facteur de transcription diminue rapidement (Finkelstein et Gibson, 2001 ; Finkelstein *et al.*, 2002). Teaster *et al* (2007) ont émis l'hypothèse que les effets des NAE sur le développement des jeunes plantules s'exercent grâce à l'augmentation de la quantité du facteur de transcription ABI3. On peut donc supposer que la surexpression d'At1g78690p responsable de l'augmentation de la quantité de NAE et potentiellement de NAE dans les graines soit responsable de l'arrêt de développement de ces plantules par l'augmentation de la quantité d'ABI3. Ainsi, il pourrait être envisagé de mesurer la quantité de ce facteur de transcription dans les graines des différentes lignées ainsi que d'étudier l'effet de la surexpression d'At1g78690 sur l'expression des gènes impliqués dans le développement des jeunes plantules notamment ceux intervenant pour la β -oxydation, la néoglucogenèse, la lipolyse etc.

D'autre part, l'application de NAE exogènes est responsable d'une désorganisation du cytosquelette des cellules d'*A. thaliana* (Blancaflor *et al.*, 2003) ainsi que très probablement d'une perturbation du trafic vésiculaire (données non publiées mais disponibles sur le site [http:// www.biol.unt.edu /~chapman / research%20projects / nae / function.Htm](http://www.biol.unt.edu/~chapman/research%20projects/nae/function.Htm)). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de la surexpression du gène At1g78690 sur le trafic des vésicules COPI et COPII chez ces plantes « 35S ». Les premières images obtenues à l'aide d'un microscope confocal sur des racines de plantes 35S::At1g78690 transformées transitoirement avec la protéine ERD2-EYFP, marqueur des

vésicules COPI et COPII (coat protein), ont révélé la présence d'agrégats fusiformes ne correspondant ni à du RE, ni à des vésicules golgiennes « classiques » (figure V-3).

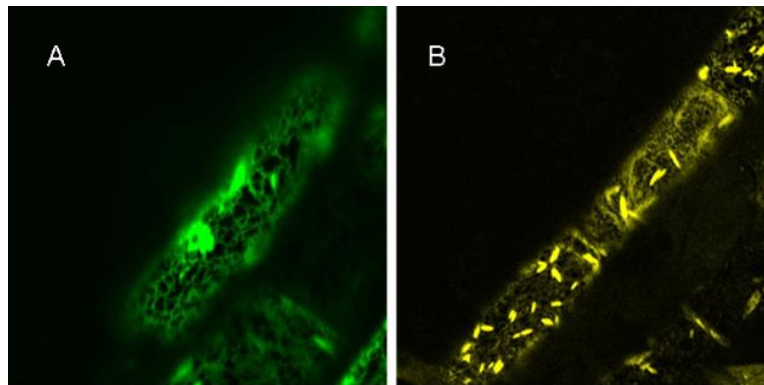


Figure V-3. Effet de la surexpression du transcrit At1g78690 sur le trafic vésiculaire chez *A. thaliana*.

A, Observation de la fluorescence émise par la protéine EGFP (dont le gène est porté par le plasmide pK7WG2D) chez les plantes 35S::At1g78690 ; B, observation de la protéine ERD2::EYFP. Les observations ont été effectuées au niveau des cellules de la racine à l'aide d'un microscope confocal à 514 nm pour l'observation de la protéine ERD2::EYFP et de 488 nm pour la protéine EGFP.

Ces premiers résultats suggèrent que la surexpression du transcrit de la NAPE synthase et donc que l'augmentation de la quantité de NAPE, perturbe le transport interne des cellules tout comme l'addition de NAE exogènes (Blancaflor *et al.*, 2003). Cependant l'augmentation de la quantité de NAPE chez les plantes 35S::At1g78690 ne s'accompagne pas d'un accroissement de la quantité de NAE puisque l'hydrolyse des NAE catalysée par les PLD semble être l'étape limitante pour la synthèse de ce lipide (dans des conditions « normales » de culture). L'utilisation du pathogène *A. tumefaciens* lors de la transformation transitoire des plantes surexprimant le gène d'intérêt pourrait être responsable d'un stress entraînant l'activation de PLD permettant une augmentation de la quantité de NAE chez ces plantes. L'augmentation de la synthèse de ce lipide pourrait alors être responsable de la désorganisation du cytosquelette observée figure V-3. Pour valider cette hypothèse, l'augmentation de la quantité de NAE chez les plantes 35S::At1g78690 infectées par *A. tumefaciens* devra être vérifiée.

Maintenant que nous connaissons l'ensemble des gènes de la voie métabolique des NAE, il est désormais possible de modifier le niveau d'expression de chaque enzyme (en surexprimant ou en réprimant l'un ou l'autre des différents gènes de la voie). Par exemple, la réalisation du double transformant 35S::At1g78690 et 35S::NAPE-PLD (cf. « Données Bibliographiques ») permettrait d'obtenir des plantes pour lesquelles les NAPE synthétisées en grande quantité pourraient être métabolisées en NAE dans des conditions « normales » de culture. L'obtention de ces doubles mutants permettrait alors d'étudier les effets *in planta*

de l'augmentation de NAE chez ces plantes (tailles des racines, germination, trafic vésiculaire, etc.).

Les voies de signalisations impliquant les NAE se terminent notamment par leur hydrolyse catalysée par les FAAH. Ces NAE peuvent également être métabolisés par des lipoxygénases. Ces enzymes permettent de convertir ces NAE en NAE-oxylipides. Nous ne disposons que de peu d'informations concernant cette famille de lipides. Il a été supposé qu'ils puissent être impliqués dans la germination chez le coton (Shrestha *et al.*, 2002).

La transformation d'une lignée accumulant les NAE par la construction 35S::13-LOX pourrait permettre d'obtenir des mutants ayant une quantité de NAE-oxylipides plus importante. Ces nouvelles lignées pourront être utilisées afin d'étudier les effets, *in planta*, des NAE-oxylipides notamment sur la germination. Les oxylipides sont également connus pour avoir de nombreux effets sur le développement des racines comme la mise en place de courbures régulières au fur et à mesure de leur croissance (Vellosillo *et al.*, 2007). Il serait donc intéressant d'étudier les effets de l'augmentation des NAE-oxylipides sur cette partie de la plante.

L'étude des NAE-oxylipides chez les plantes et des effets de l'augmentation de la quantité de NAE chez *A. thaliana* fera d'ailleurs l'objet de mon prochain projet de recherche au « centre de recherche des lipides de plantes » à l'université de l'UNT (University of North Texas) sous la direction du Pr Chapman.

PARTIE VI

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

A

- ✓ **Adam AL, Pike S, Hoyos ME, Stone JM, Walker JC, Novacky A.** (1997) Rapid and transient activation of a myelin basic protein kinase in tobacco leaves treated with harpin from *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol.* 115(2):853-861.
- ✓ **Ahn K, Johnson DS, Mileni M, Beidler D, Long JZ, McKinney MK, Weerapana E, Sadagopan N, Liimatta M, Smith SE, Lazerwith S, Stiff C, Kamtekar S, Bhattacharya K, Zhang Y, Swaney S, Van Becelaere K, Stevens RC, Cravatt BF.** (2009) Discovery and characterization of a highly selective FAAH inhibitor that reduces inflammatory pain. *Chem Biol.* 16(4):411-20.
- ✓ **Akram A, Ongena M, Duby F, Dommes J, Thonart P.** (2008) Systemic resistance and lipoxygenase-related defence response induced in tomato by *Pseudomonas putida* strain BTP1. *BMC Plant Biol.* 10;8:113.
- ✓ **Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR.** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science.* 301(5633):653-7.
- ✓ **Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C.** (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell.* 92(6):773-84.
- ✓ **Andre C and Benning C.** (2007) *Arabidopsis* seedlings deficient in a plastidic pyruvate kinase are unable to utilize seed storage compounds for germination and establishment. *Plant Physiol.* 45(4):1670-80.
- ✓ **Arthur G and Page L.** (1991) Synthesis of phosphatidylethanolamine and ethanolamine plasmalogen by the CDP-ethanolamine and decarboxylase pathways in rat heart, kidney and liver. *Biochem J.* 273(Pt 1):121-5.

- ✓ **Athenstaedt K and Daum G.** (1997) Biosynthesis of phosphatidic acid in lipid particles and endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 179(24):7611-6.
- ✓ **Atkinson MM, Huang JS, Knopp JA.** (1985) The hypersensitive reaction of tobacco to *pseudomonas syringae* pv. *lisi*: activation of a plasmalemma K/H exchange mechanism. PlantPhysiol. 79(3):843-847.
- ✓ **Atkinson MM, Keppler LD, Orlandi EW, Baker CJ, Mischke CF.** (1990) Involvement of plasma membrane calcium influx in bacterial induction of the K/H and hypersensitive responses in tobacco. Plant Physiol. 92(1):215-221.
- ✓ **Austin-Brown SL and Chapman KD.** (2002) Inhibition of phospholipase D alpha by N-acylethanolamines. Plant Physiol. 129(4):1892-8.

B

- ✓ **Balla T.** (2006) Phosphoinositide-derived messengers in endocrine signaling. J Endocrinol. 188(2):135-53.
- ✓ **Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, Nakai K, Miyano S.** (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. Bioinformatics. 18(2):298-305.
- ✓ **Bargmann BO, Laxalt AM, ter Riet B, van Schooten B, Merquiol E, Testerink C, Haring MA, Bartels D, Munnik T.** (2009) Multiple PLD required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant Cell Physiol.* 50:78-89.
- ✓ **Bari R, and Jones JD.** (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. Plant Mol Biol. 69(4):473-88.
- ✓ **Bassel GW, Mullen RT, Bewley JD.** (2006) ABI3 expression ceases following, but not during, germination of tomato and *Arabidopsis* seeds. J Exp Bot. 57(6):1291-7.
- ✓ **Batoko H, Zheng HQ, Hawes C, Moore I.** (2000) A rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and golgi apparatus and for normal golgi movement in plants. Plant Cell. 12(11):2201-18.
- ✓ **Berdyshev EV, Schmid PC, Dong ZG, Schmid HHO.** (2000) Stress-induced generation of N-acylethanolamines in mouse epidermal JB6-P_ cells. Biochem J 346: 369–74.
- ✓ **Berrendero F, Sepe N, Ramos JA, Di Marzo V, Fernández-Ruiz JJ.** (1999) Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. Synapse. 33(3):181-91.

- ✓ **Bessoule JJ, Lessire R, Cassagne C.** (1989) Theoretical analysis of the activity of membrane-bound enzymes using amphiphilic or hydrophobic substrates. *Biochim Biophys Acta* 983: 35-41.
- ✓ **Bessoule JJ, Testet E, Cassagne C.** (1995) Synthesis of phosphatidylcholine in the chloroplast envelope after import of lysophosphatidylcholine from endoplasmic reticulum membranes. *Eur J Biochem.* 228(2):490-7.
- ✓ **Bhat RA and Panstruga R.** (2005) Lipid rafts in plants. *Planta.* 223(1):5-19.
- ✓ **Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ, Di Marzo V.** (1999) Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun.* 256(2):377-80.
- ✓ **Bisogno T, Ventriglia M, Milone A, Mosca M, Cimino G, Di Marzo V.** (1997) Occurrence and metabolism of anandamide and related acyl-ethanolamides in ovaries of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Biochim Biophys Acta.* 1345(3):338-48.
- ✓ **Blancaflor EB, Hou G, Chapman KD.** (2003) Elevated levels of N-lauroylethanolamine, an endogenous constituent of desiccated seeds, disrupt normal root development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Planta.* 217(2):206-17.
- ✓ **Bohn M, Heinz E, Luthje S.** (2001) Lipid composition and fluidity of plasma membranes isolated from corn (*Zea mays* L.) roots. *Arch Biochem Biophys.* 387(1):35-40.
- ✓ **Bologna G, Yvon C, Duvaud S, Veuthey AL.** (2004) N-Terminal myristoylation predictions by ensembles of neutral networks. *Proteomics.* 4(6):1626-32.
- ✓ **Bomstein RA.** (1965) A new class of phosphatides isolated from soft wheat flour. *Biochem Biophys Res Commun.* 21(1):49-54.
- ✓ **Bonaventure G, Salas JJ, Pollard MR, Ohlrogge JB.** (2003) Disruption of the FATB gene in *Arabidopsis* demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *Plant Cell.* 15(4):1020-33.
- ✓ **Bosson R, Jaquenoud M, Conzelmann A.** (2006) GUP1 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an O-acyltransferase involved in remodeling of the GPI anchor. *Mol Biol Cell.* 17(6):2636-45.
- ✓ **Bourgis F, Kader JC, Barret P, Renard M, Robinson D, Robinson C, Delseny M, Roscoe TJ.** (1999) A plastidial lysophosphatidic acid acyltransferase from oilseed rape. *Plant Physiol.* 120(3):913-22.

- ✓ **Bourre JM, Piciotti M, Dumont O, Pascal G, Durand G.** (1990) Dietary linoleic acid and polyunsaturated fatty acids in rat brain and other organs. Minimal requirements of linoleic acid. *Lipids*. 25(8):465-72.
- ✓ **Brisson LF, Tenhaken R, Lamb C.** (1994) Function of Oxidative Cross-Linking of Cell Wall Structural Proteins in Plant Disease Resistance. *Plant Cell*. 6(12):1703-1712.
- ✓ **Brown AP, Brough CL, Kroon JT, Slabas AR.** (1995) Identification of a cDNA that encodes a 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransférase from *Limnanthes douglasii*. *Plant Mol Biol*. 29(2):267-78.
- ✓ **Brown OR, Howitt HF, Stees JL, Platner WS.** (1971) Effects of hyperoxia on composition and rate of synthesis of fatty acids in *Escherichia coli*. *J Lipid Res*. 12(6):692-8.
- ✓ **Browse J and Somerville C.** (1991) Plant Lipids: Metabolism, Mutants, and Membranes. *Science*. 252(5002):80-87.
- ✓ **Browse J and Somerville C.** (1994) Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:467-506.

C

- ✓ **Cacas JL, Vaillau F, Davoine C, Ennar N, Agnel JP, Tronchet M, Ponchet M, Blein JP, Roby D, Triantaphylides C, Montillet JL.** (2005) The combined action of 9 lipoxygenase and galactolipase is sufficient to bring about programmed cell death during tobacco hypersensitive response. *Plant, Cell & Environment* 28(11):1367-1378.
- ✓ **Cadas H, Di Tomaso E, Piomelli D.** (1997) Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci*. 17(4):1226-42.
- ✓ **Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli DJ.** (1996) Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and AMP. *Neurosci*. 16(12):3934-42.
- ✓ **Cahill L and McGaugh JL.** (1998) Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci*. 21(7):294-9.
- ✓ **Cai SJ, McAndrew RS, Leonard BP, Chapman KD, Pidgeon C.** (1995) Rapid purification of cotton seed membrane-bound N-acylphosphatidylethanolamine synthase by immobilized artificial membrane chromatography. *J Chromatogr A*. 696(1):49-62.

- ✓ **Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D.** (1998) Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*. 394(6690):277-81.
- ✓ **Cernac A, Andre C, Hoffmann-Benning S, Benning C.** (2006) WRI1 is required for seed germination and seedling establishment. *Plant Physiol*. 141(2):745-57.
- ✓ **Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sandermann H Jr, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W.** (1998) Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(10):5818-23.
- ✓ **Chapman KD.** (2004) Occurrence, metabolism, and prospective functions of N-acylethanolamines in plants. *Prog Lipid Res*. 43(4):302-27.
- ✓ **Chapman KD, Lin I, DeSouza AD.** (1995) Metabolism of cottonseed microsomal N-acylphosphatidylethanolamine. *Arch Biochem Biophys*. 318(2):401-7
- ✓ **Chapman KD and Moore TS Jr.** (1993a) N-acylphosphatidylethanolamine synthesis in plants: occurrence, molecular composition, and phospholipid origin. *Arch Biochem Biophys*. 301(1):21-33.
- ✓ **Chapman KD and Moore TS Jr.** (1993b) Catalytic Properties of a Newly Discovered Acyltransferase That Synthesizes N-Acylphosphatidylethanolamine in Cottonseed (*Gossypium hirsutum* L.) Microsomes. *Plant Physiol*. 102(3):761-769.
- ✓ **Chapman KD and Sriparameswaran A.** (1997) Intracellular localization of N-Acylphosphatidylethanolamine synthesis in cotyledons of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings. *Plant Cell Physiol*. 38(12):1359-67.
- ✓ **Chapman KD, Tripathy S, Venables B, Desouza AD.** (1998) N-Acylethanolamines: formation and molecular composition of a new class of plant lipids. *Plant Physiol*. 116(3):1163-8.
- ✓ **Chapman KD, Venables B, Markovic R, Blair Jr RW, Bettinger C.** (1999) N-Acylethanolamines in seeds. Quantification of molecular species and their degradation upon imbibition *Plant Physiol*. 120(4):1157-64.
- ✓ **Childers SR and Breivogel CS.** (1998) Cannabis and endogenous cannabinoid systems. *Drug Alcohol Depend*. 51(1-2):173-87.
- ✓ **Claros MG and Von Heijne G.** (1994) TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput Appl Biosci*. 10(6):685-6.
- ✓ **Clough SJ and Bent AF.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 16(6):735-43.
- ✓ **Cohen P, Miyazaki M, Socci ND, Hagge-Greenberg A, Liedtke W, Soukas AA, Sharma R, Hudgins LC, Ntambi JM, Friedman JM.** (2002) Role for stearyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss. *Science*. 297(5579):240-3.

- ✓ **Cohen S, Dadi H, Shaoul E, Sharfe N, Roifman CM.** (1999) Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. *Blood*. 93(6):2013-24.
- ✓ **Colley WC, Sung TC, Roll R, Jenco J, Hammond SM, Altshuler Y, Bar-Sagi D, Morris AJ, Frohman MA.** (1997) Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr Biol*. 7(3):191-201.
- ✓ **Corpet F.** (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16, 10881-10890.
- ✓ **Cramer CL, Ryder TB, Bell JN, Lamb CJ.** (1985) Rapid switching of plant gene expression induced by fungal elicitor. *Science*. 227:1240-42.
- ✓ **Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB.** (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 384(6604):83-7.
- ✓ **Cravatt BF and Lichtman AH.** (2002) The enzymatic inactivation of the fatty acid amide class of signaling lipids. *Chem Phys Lipids*. 121(1-2):135-48.
- ✓ **Cravatt BF, Prospero-Garcia O, Siuzdak G, Gilula NB, Henriksen SJ, Boger DL, Lerner RA.** (1995) Chemical characterization of a family of brain lipids that induce sleep. *Science*. 268(5216):1506-9.
- ✓ **Creelman RA and Mullet JE.** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 48:355-381.
- ✓ **Cronan JE and Bell RM.** (1974) Mutants of *Escherichia coli* defective in membrane phospholipid synthesis: mapping of sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase Km mutants. *J Bacteriol*. 120(1):227-33.

D

- ✓ **Dahlqvist A, Stahl U, Lenman M, Banas A, Lee M, Sangader L, Ronne H, Stymne S.** (2000) Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: an enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(12):6487-92.
- ✓ **Dawson RM, Clarke N, Quarles RH.** (1969) N-acylphosphatidylethanolamine, a phospholipid that is rapidly metabolized during the early germination of pea seeds. *Biochem J*. 114(2):265-7.

- ✓ **Debeaujon I and Koornneef M.** (2000) Gibberellin requirement for *Arabidopsis* seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic abscisic acid. *Plant Physiol.* 122(2):415-24.
- ✓ **De Siervo AJ.** (1969) Alterations in the phospholipid composition of *Escherichia coli* B during growth at different temperatures. *J Bacteriol.* 100(3):1342-9
- ✓ **Desarnaud F, Cadas H, Piomelli D.** (1995) Anandamide amidohydrolase activity in rat brain microsomes. Identification and partial characterization. *J Biol Chem.* 270(11):6030-5.
- ✓ **Deutsch DG and Chin SA.** (1993) Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol.* 46(5):791-6.
- ✓ **Deutsch DG, Goligorsky MS, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Das SK, Dey SK, Arreaza G, Thorup C, Stefano G, Moore LC.** (1997) Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J Clin Invest.* 100(6):1538-46.
- ✓ **DeYoung BJ and Innes RW.** (2006) Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat Immunol.* 7(12):1243-9.
- ✓ **Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R.** (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 258(5090):1946-9.
- ✓ **Di Marzo V.** (1998) 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim Biophys Acta.* 1392(2-3):153-75.
- ✓ **Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D.** (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.* 372(6507):686-91.
- ✓ **Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátakai S, Járαι Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G.** (2001b) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature.* 410(6830):822-5.
- ✓ **Di Marzo V, Melck D, Orlando P, Bisogno T, Zagoory O, Bifulco M, Vogel Z, De Petrocellis L.** (2001a) Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *Biochem J.* 358(Pt 1):249-55.
- ✓ **Dixon RA and Paiva NL.** (1995) Stress-induced phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell.* 7(7):1085-1097.
- ✓ **Domingo JC, Mora M, Africa de Madariaga M.** (1993) Incorporation of N-acylethanolamine phospholipids into egg phosphatidylcholine vesicles:

characterization and permeability properties of the binary systems. *Biochim Biophys Acta* 1148: 308-316.

- ✓ **Domingo JC, Mora M, Africa de Madariaga M.** (1994) Role of headgroup structure in the phase behaviour of N-acylethanolamine phospholipids: hydrogen-bonding ability and headgroup size. *Chem Phys Lipids*. 69(3):229-40.
- ✓ **Douce R and Joyard J.** (1978) The chloroplast envelope: an unusual cell membrane system. *Dev Plant Biol.* 3(Adv. Biochem Physiol Plant Lipids), 79-98.
- ✓ **Douglas CJ.** (1996) Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends Plant Sci* 1:171–178.

E

- ✓ **Eastmond PJ.** (2006) SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell*. 18(3):665-75.
- ✓ **Eastmond PJ.** (2007) MONODEHYDROASCORBATE REDUCTASE4 is required for seed storage oil hydrolysis and postgerminative growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 19(4):1376-87.
- ✓ **Edwards K, Johnstone C, Thompson C.** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19(6):1349.
- ✓ **Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G.** (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol.* 300(4):1005-16.
- ✓ **Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G.** (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* 8(5):978-84.
- ✓ **Enyedi AJ, Yalpani N, Silverman P, Raskin I.** (1992) Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell*. 70(6):879-86.
- ✓ **Epps DE, Natarajan V, Schmid PC, Schmid HO.** (1980) Accumulation of N-acylethanolamine glycerophospholipids in infarcted myocardium. *Biochim Biophys Acta*. 618(3):420-30.
- ✓ **Epps DE, Schmid PC, Natarajan V, Schmid HH.** (1979) N-Acylethanolamine accumulation in infarcted myocardium. *Biochem Biophys Res Commun.* 90(2):628-33.

F

- ✓ **Farag KM and Plata JP.** (1993) Use of lysophosphatidylethanolamine, a natural lipid, to retard tomato leaf and fruit senescence. *Physiol plant.* 87:515-24.
- ✓ **Faure L, Coulon D, Laroche-Traineau J, Le Guedard M, Schmitter JM, Testet E, Lessire R, Bessoule JJ.** (2009) Discovery and characterization of an *Arabidopsis thaliana* N-acylphosphatidylethanolamine synthase. *J Biol Chem.* 284(28):18734-41.
- ✓ **Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggin RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW.** (1996) Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* 393(2-3):231-5.
- ✓ **Fezza F, Gasperi V, Mazzei C, Maccarrone M.** (2004) Radiochromatographic assay of N-acyl-phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D activity. *Anal Biochem.* 2005 Apr 1;339(1):113-20.
- ✓ **Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD.** (2002) Absciscic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell.* 14 Suppl:S15-45.
- ✓ **Finkelstein RR and Gibson SI.** (2002) ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Curr Opin Plant Biol.* 5(1):26-32.
- ✓ **Folch J, Lees M, Sloane stanley GH.** (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 226(1):497-509.
- ✓ **Frank W, Munnik T, Kerkmann K, Salamini F, Bartels D.** (2000) Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell.* 12(1):111-24.
- ✓ **Frentzen M, Heinz E, McKeon TA, Stumpf PK.** (1983) Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts. *Eur J Biochem.* 129(3):629-36.
- ✓ **Freund TF, Katona I, Piomelli D.** (2003) Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.* 83(3):1017-66.
- ✓ **Friedman JM, and Halaas JL.** (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 395,763-770.
- ✓ **Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodríguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D.** (2003) Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature.* 425(6953):90-3.

- ✓ **Fu J, Oveisi F, Gaetani S, Lin E, Piomelli D.** 2005 Oleoylethanolamide, an endogenous PPAR-alpha agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology*. 48(8):1147-53.

G

- ✓ **Gaetani S, Cuomo V, Piomelli D.** (2003) Anandamide hydrolysis: a new target for anti-anxiety drugs? *Trends Mol. Med.* 9:947-478.
- ✓ **Gardiner JC, Harper JD, Weerakoon ND, Collings DA, Ritchie S, Gilroy S, Cyr RJ, Marc J.** (2001) A 90-kD phospholipase D from tobacco binds to microtubules and the plasma membrane. *Plant Cell*. 13(9):2143-58.
- ✓ **Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivani I, Appel RD, Bairoch A.** 2003 Expasy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31(13):3784-8.
- ✓ **Germain V, Rylott EL, Larson TR, Sherson SM, Bechtold N, Carde JP, Bryce JH, Graham IA, Smith SM.** (2001) Requirement for 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 in peroxisome development, fatty acid beta-oxidation and breakdown of triacylglycerol in lipid bodies of *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* 28(1):1-12.
- ✓ **Giang DK and Cravatt BF.** (1997) Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(6):2238-42.
- ✓ **Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D.** (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci.* 2(4):358-63.
- ✓ **Giuffrida A and Piomelli D.** (1998) Isotope dilution GC/MS determination of anandamide and other fatty acylethanolamides in rat blood plasma. *FEBS Lett.* 422(3):373-6.
- ✓ **González S, Manzanares J, Berrendero F, Wenger T, Corchero J, Bisogno T, Romero J, Fuentes JA, Di Marzo V, Ramos JA, Fernández-Ruiz J.** (1999) Identification of endocannabinoids and cannabinoid CB(1) receptor mRNA in the pituitary gland. *Neuroendocrinology.* 70(2):137-45.
- ✓ **Goparaju SK, Kurahashi Y, Suzuki H, Ueda N, Yamamoto S.** (1999) Anandamide amidohydrolase of porcine brain: cDNA cloning, functional expression and site-directed mutagenesis(1). *Biochim Biophys Acta.* 1441(1):77-84.
- ✓ **Grab D, Feger M, Ebel J.** (1989) An endogenous factor from soybean (*Glycine max* L.) cell cultures activates phosphorylation of protein which is dephosphorylated *in vivo* in elicitor challenged cells. *Planta* 179:485-90.

- ✓ **Guan X, Cravatt BF, Ehrling GR, Hall JE, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB.** (1997) The sleep-inducing lipid oleamide deconvolutes gap junction communication and calcium wave transmission in glial cells. *J Cell Biol.* 139(7):1785-92.

H

- ✓ **Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P.** (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation *Plant Mol Biol.* 25(6):989-94.
- ✓ **Hammond SM, Altshuler YM, Sung TC, Rudge SA, Rose K, Engebrecht J, Morris AJ, Frohman MA.** (1995) Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J Biol Chem.* 270(50):29640-3.
- ✓ **Hampson RE and Deadwyler SA.** (1998) Role of cannabinoid receptors in memory storage. *Neurobiol Dis.* 5(6 Pt B):474-82.
- ✓ **Hanania U and Avni A.** (1997) High-affinity binding site for ethylene-inducing xylanase elicitor on *Nicotiana tabacum* membranes. *Plant J.* 12:113-20.
- ✓ **Hansen HH, Hansen SH, Bjørnsdottir I, Hansen HS.** (1999) Electrospray ionization mass spectrometric method for the determination of cannabinoid precursors: N-acylethanolamine phospholipids (NAPE). *J Mass Spectrom.* 34(7):761-7.
- ✓ **Hansen HH, Hansen SH, Schousboe A, Hansen HS.** (2000) Determination of the phospholipid precursor of anandamide and other N-acylethanolamine phospholipids before and after sodium azide-induced toxicity in cultured neocortical neurons. *J Neurochem.* 75(2):861-71.
- ✓ **Hansen HS, Lauritzen L, Moesgaard B, Strand AM, Hansen HH.** (1998) Formation of N-acyl-phosphatidylethanolamines and N-acylethanolamines: proposed role in neurotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 55(6):719-25.
- ✓ **Hansen HS, Moesgaard B, Hansen HH, Petersen G.** (2000) N-Acylethanolamines and precursor phospholipids - relation to cell injury. *Chem Phys Lipids.* 108(1-2):135-50.
- ✓ **Hansen HS, Moesgaard B, Petersen G, Hansen HH.** (2002) Putative neuroprotective actions of N-acyl-ethanolamines. *Pharmacol Ther.* 95(2):119-26.
- ✓ **Hayashi M, Toriyama K, Kondo M, Nishimura M.** (1998) 2,4-Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of *Arabidopsis* have defects in glyoxysomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Cell.* 10(2):183-95.
- ✓ **Helmy FM, Mueller TE, Juracka A.** (2002) Determination of the phospholipid profile of *E.coli* by TLC with thionine as spot-test reagent. Recognition of cardiolipin,

phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, and N-acyl phosphatidylethanolamine. JPC. 15(1):23-27.

- ✓ **Higashijima T, Uzu S, Nakajima T, Ross EM.** (1988) Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). J Biol Chem. 263(14):6491-4.
- ✓ **Hillard CJ and Campbell WB.** (1997) Biochemistry and pharmacology of arachidonylethanolamide, a putative endogenous cannabinoid. J Lipid Res. 38(12):2383-98.
- ✓ **Hillard CJ, Wilkison DM, Edgemond WS, Campbell WB.** (1995) Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonylethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain. Biochim Biophys Acta. 1257(3):249-56.
- ✓ **Hofmann K.** (2000) A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. Trends Biochem Sci. 25(3):111-2.
- ✓ **Hofmann K and Stoffel W.** (1993) TMbase-A database of membrane spanning proteins segments Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374:166.
- ✓ **Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJ.** (2008) Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. New Phytol. 179(1):33-54.

I/J

- ✓ **Jabs T, Tschope M, Colling C, Hahlbrock K, Scheel D.** (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. Proc Natl Acad Sci USA. 94(9):4800-5.
- ✓ **Jacobsen JV, Pearce DW, Poole AT, Pharis RP, Mander LN.** (2002) Absciscic acid, phaseic acid and gibberellin contents associated with dormancy and germination in barley. Physiol Plant. 115(3):428-441.
- ✓ **Janero DR.** (2001) Nutritional aspect of nitric oxide: human health implication and therapeutic opportunities. Nutrition. 17:896-903.
- ✓ **Jin XH, Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N.** (2007) Discovery and characterization of a Ca²⁺ independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferase generating the anandamide precursor and its congeners. J Biol Chem. 282(6):3614-23.

- ✓ **Juguelin H, Heape A, Boiron F, Cassagne C.** (1986) A quantitative developmental study of neutral lipids during myelinogenesis in the peripheral nervous system of normal and trembler mice. *Brain Res.* 390(2):249-52.

K

- ✓ **Kang L, Wang YS, Uppalapati SR, Wang K, Tang Y, Vadapalli V, Venables BJ, Chapman KD, Blancaflor EB, Mysore KS.** (2008) Overexpression of a fatty acid amide hydrolase compromises innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant J.* 56(2):336-49.
- ✓ **Karimi M, Inzé D, Depicker A.** (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7(5):193-5.
- ✓ **Karsak M, Gaffal E, Date R, Wang-Eckhardt L, Rehnelt J, Petrosino S, Starowicz K, Steuder R, Schlicker E, Cravatt B, Mechoulam R, Buettner R, Werner S, Di Marzo V, Tüting T, Zimmer A.** (2007) Attenuation of allergic contact dermatitis through the endocannabinoid system. *Science.* 316(5830):1494-7.
- ✓ **Katayama K, Ueda N, Kurahashi Y, Suzuki H, Yamamoto S, Kato I.** (1997) Distribution of anandamide amidohydrolase in rat tissues with special reference to small intestine. *Biochim Biophys Acta.* 1347(2-3):212-8.
- ✓ **Kellogg EW 3rd and Fridovich I.** (1975) Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J Biol Chem.* 250(22):8812-7.
- ✓ **Kennedy EP and Weiss SB.** (1956) The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *J Biol Chem.* 222(1):193-214.
- ✓ **Koga D, Santa T, Fukushima T, Homma H, Imai K.** (1997) Liquid chromatographic-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric determination of anandamide and its analogs in rat brain and peripheral tissues. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 690(1-2):7-13.
- ✓ **Koncz C, Németh K, Rédei GP, Schell J.** (1992) ADN-T insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.* 20(5):963-76.
- ✓ **Kondo S, Sugiura T, Kodaka T, Kudo N, Waku K, Tokumura A.** (1998) Accumulation of various N-acylethanolamines including N-arachidonylethanolamine (anandamide) in cadmium chloride-administered rat testis. *Arch Biochem Biophys.* 354(2):303-10.
- ✓ **Koutek B, Prestwich GD, Howlett AC, Chin SA, Salehani D, Akhavan N, Deutsch DG.** (1994) Inhibitors of arachidonoyl ethanolamide hydrolysis. *J Biol Chem.* 269(37):22937-40.

- ✓ **Kilaru A, Blancaflor EB, Venables BJ, Tripathy S, Mysore KS, Chapman KD.** (2007) The N-acyl ethanolamine-mediated regulatory pathway in plants. *Chem Biodivers.* (8):1933-55.
- ✓ **Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL.** (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol.* 305(3):567-80.
- ✓ **Kusano H, Testerink C, Vermeer JE, Tsuge T, Shimada H, Oka A, Munnik T, Aoyama T.** (2008) The *Arabidopsis* phosphatidylinositol phosphate 5-kinase PIP5K3 is a key regulator of root hair tip growth. *Plant Cell.* 20:367-80.
- ✓ **Kuwae T, Schmid PC, Johnson SB, Schmid HH.** (1990) Differential turnover of phospholipid acyl groups in mouse peritoneal macrophages. *J Biol Chem.* 265(9):5002-7.
- ✓ **Kuwae T, Schmid PC, Schmid HH.** (1997) Alterations of fatty acyl turnover in macrophage glycerolipids induced by stimulation. Evidence for enhanced recycling of arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1344(1):74-86.
- ✓ **Kuwae T, Shiota Y, Schmid PC, Krebsbach R, Schmid HH.** (1999) Biosynthesis and turnover of anandamide and other N-acyl ethanolamines in peritoneal macrophages. *FEBS Lett.* 459(1):123-7.
- ✓ **Kyte J and Doolittle RF.** (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Bio.* 157:105-132.

L

- ✓ **La Camera S., Gouzerh G., Dhondt S., Hoffmann L., Fritig B., Legrand M. and Heitz, T.** 2004. Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunol. Rev.* 198:267-284.
- ✓ **Laemmli UK.** 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-5
- ✓ **Lafrance CP, Blochet JE, Pézolet M.** (1997) N-acylphosphatidylethanolamines: effect of the N-acyl chain length on its orientation. *Biophys J.* 72(6):2559-68.
- ✓ **Lafrance D, Marion D, Pézolet M.** (1990) Study of the structure of N-acyldipalmitoylphosphatidylethanolamines in aqueous dispersion by infrared and Raman spectroscopies. *Biochemistry.* 29(19):4592-9.
- ✓ **Lamb C and Dixon RA.** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48:251-275.

- ✓ **Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A.** (2006) Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol.* 171(2):249-69.
- ✓ **Lee Y, Kim YW, Jeon BW, Park KY, Suh SJ, Seo J, Kwak JM, Martinoia E, Hwang I, Lee Y.** (2007) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is important for stomatal opening. *Plant J.* 52(5):803-16.
- ✓ **Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C.** (1997) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell.* 79(4):583-93.
- ✓ **Leweke FM, Giuffrida A, Wurster U, Emrich HM, Piomelli D.** (1999) Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. *Neuroreport.* 10(8):1665-9.
- ✓ **Lewin TM, Wang P, Coleman RA.** (1999) Analysis of amino acid motifs diagnostic for the glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction. *Biochemistry.* 38(18):5764-71.
- ✓ **Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, Tang X.** (2000) Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J.* 345 Pt 3:401-15.
- ✓ **Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou Z, Huang BX, Kim HY, Kunos G.** (2006) A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(36):13345-50.
- ✓ **Lopez-Molina L, Mongrand S, McLachlin DT, Chait BT, Chua NH.** (2002) ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant J.* 32(3):317-28.
- ✓ **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-75.
- ✓ **Lynch DV and Steponkus PL.** (1987) Plasma membrane lipid alterations associated with cold acclimation of winter Rye seedlings (*Secale cereale L. cv Puma*). *Plant Physiol.* 83(4):761-67.
- ✓ **Lyou SH, Park HJ, Jung C, Sohn HB, Lee G, Kim CH, Kim M, Choi YD, Cheong JJ.** (2009) The *Arabidopsis* AtLEC gene encoding a lectin-like protein is up-regulated by multiple stimuli including developmental signal, wounding, jasmonate, ethylene, and chitin elicitor. *Mol Cells.* 27(1):75-81.

M

- ✓ **Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B.** (2002) The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418:530-34.

- ✓ **Marmey P, Jalloul A, Alhamdia M, Assigbetse K, Cacas JL, Voloudakis AE, Champion A, Clerivet A, Montillet JL, Nicole M.** (2007) The 9-lipoxygenase GhLOX1 gene is associated with the hypersensitive reaction of cotton *Gossypium hirsutum* to *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. Plant Physiol Biochem. 45(8):596-606.
- ✓ **Martin BR, Mechoulam R, Razdan RK.** (1999) Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. Life Sci. 65(6-7):573-95.
- ✓ **Matsumoto K, Fujiwara Y, Nagai R, Yoshida M, Ueda S.** (2008) Expression of two isozymes of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 and -2 in clear cell type renal cell carcinoma. Int J Urol. 15(2):166-70.
- ✓ **Maurelli S, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Luccia A, Marino G, Di Marzo V.** (1995) novel classes of neuroactive fatty acid amides are substrates for mouse neuroblastoma 'anandamide amidohydrolase'. FEBS Lett. 377(1):82-6.
- ✓ **Maurer-Stroh S and Eisenhaber F.** (2005) Refinement and prediction of protein prenylation motifs. Genome Biol. 6(6):R55.
- ✓ **Mazzola C, Medalie J, Scherma M, Panlilio LV, Solinas M, Tanda G, Drago F, Cadet JL, Goldberg SR, Yasar S.** (2009) Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors. Learn Mem. 16(5):332-7.
- ✓ **McAndrew RS and Chapman KD.** (1998) Enzymology of cottonseed microsomal N-acylphosphatidylethanolamine synthase: kinetic properties and mechanism-based inactivation. Biochim Biophys Acta. 1390(1):21-36.
- ✓ **McFarland MJ, Terebova EA, Barker EL.** (2006) Detergent-Resistant Membrane Microdomains in the Disposition of the Lipid Signaling Molecule Anandamide. The AAPS Journal 11:95-100.
- ✓ **Mechoulam R, Fride E, Di Marzo V.** (1998) Endocannabinoids. Eur J Pharmacol. 359(1):1-18.
- ✓ **Meijer HJ and Munnik T.** (2003) Phospholipid-based signaling in plants. Annu Rev Plant Biol. 54:265-306.
- ✓ **Merkel O, Schmid PC, Paltauf F, Schmid HH.** (2005) Presence and potential signaling function of N-acylethanolamines and their phospholipid precursors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim Biophys Acta. 1734(3):215-9.
- ✓ **Mileykovskaya E and Dowhan W.** (2005) Role of membrane lipids in bacterial division-site selection. Curr Opin Microbiol. 8(2):135-42.
- ✓ **Mileykovskaya E, Ryan AC, Mo X, Lin CC, Khalaf KI, Dowhan W, Garrett TA.** (2009) Phosphatidic acid and N-acylphosphatidylethanolamine form membrane

domains in *Escherichia coli* mutant lacking cardiolipin and phosphatidylglycerol. J Biol Chem. 284(5):2990-3000.

- ✓ **Miroux B and Walker JE.** (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. J Mol Biol. 260(3):289-98.
- ✓ **Moesgaard B, Petersen G, Jaroszewski JW, Hansen HS.** (2000) Age dependent accumulation of N-acyl-ethanolamine phospholipids in ischemic rat brain. A (31)P NMR and enzyme activity study. J Lipid Res. 41(6):985-90.
- ✓ **Mongrand S, Bessoule JJ, Cassagne C.** (1997) A re-examination *in vivo* of the phosphatidylcholine-galactolipid metabolic relationship during plant lipid biosynthesis. Biochem J. 327 (Pt3):853-8.
- ✓ **Mongrand S, Cassagne C, Bessoule JJ.** (2000) Import of lyso-phosphatidylcholine into chloroplasts likely at the origin of eukaryotic plastidial lipids. Plant Physiol. 122(3):845-52.
- ✓ **Montillet JL, Chamnongpol S, Rustérucchi C, Dat J, van de Cotte B, Agnel JP, Battesti C, Inzé D, Van Breusegem F, Triantaphylidès C.** (2005) Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. Plant Physiol. 138(3):1516-26.
- ✓ **Motes CM, Pechter P, Yoo CM, Wang YS, Chapman KD, Blancaflor EB.** (2005) Differential effects of two phospholipase D inhibitors, 1-butanol and N-acyl-ethanolamine, on *in vivo* cytoskeletal organization and *Arabidopsis* seedling growth. Protoplasma. 226(3-4):109-23.
- ✓ **Movahed P, Jönsson BA, Birnir B, Wingstrand JA, Jørgensen TD, Ermund A, Sterner O, Zygmunt PM, Högestätt ED.** (2005) Endogenous unsaturated C18 N-acyl-ethanolamines are vanilloid receptor (TRPV1) agonists. J Biol Chem. 280(46):38496-504.

N

- ✓ **Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E.** (2005) Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. Plant J. 41(5):697-709.
- ✓ **Nambara E and Marion-Poll A** (2003) ABA action and interactions in seeds. Trends Plant Sci. 8(5):213-7.

- ✓ **Natarajan V, Reddy PV, Schmid PC, Schmid HH.** (1982) N-Acylation of ethanolamine phospholipids in canine myocardium. *Biochim Biophys Acta.* 712(2):342-55.
- ✓ **Natarajan V, Schmid PC, Reddy PV, Zuzarte-Augustin ML, Schmid HH.** (1985) Occurrence of N-acylethanolamine phospholipids in fish brain and spinal cord. *Biochim Biophys Acta.* 835(3):426-33.
- ✓ **Natarajan V, Schmid PC, Schmid HH.** (1986) N-acylethanolamine phospholipid metabolism in normal and ischemic rat brain. *Biochim Biophys Acta.* 878(1):32-41.
- ✓ **Nicholas, KB, Nicholas HB Jr, Deerfield DW II.** (1997) GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW.NEWS* 4:14.
- ✓ **Nishida I, Tasaka Y, Shiraishi H, Murata N.** (1993) The gene and the RNA for the precursor to the plastid-located glycerol-3-phosphate acyltransferase or *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 21(2):267-77.

O

- ✓ **Ohashi Y, Oka A, Rodrigues-Pousada R, Possenti M, Ruberti I, Morelli G, Aoyama T.** (2003) Modulation of phospholipid signaling by GLABRA2 in root-hair pattern formation. *Science.* 300(5624):1427-30.
- ✓ **Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Tonai T, Ueda N.** (2004) Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners. *J Biol Chem.* 279(7):5298-305.
- ✓ **Okamoto Y, Wang J, Morishita J, Ueda N.** (2007) Biosynthetic pathways of the endocannabinoid anandamide. *Chem Biodivers.* 4(8):1842-57.
- ✓ **Omeir RL, Arreaza G, Deutsch DG.** (1999) Identification of two serine residues involved in catalysis by fatty acid amide hydrolase. *Biochem Biophys Res Commun.* 264(2):316-20.
- ✓ **Omeir RL, Chin S, Hong Y, Ahern DG, Deutsch DG.** (1995) Arachidonoyl ethanolamide-[1,2-¹⁴C] as a substrate for anandamide amidase. *Life Sci.* 56(23-24):1999-2005.

P

- ✓ **Palta JP, Whitaker BD, Weiss LS.** (1993) Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of *Solanum* species. *Plant Physiol.* 10(3):793-803.
- ✓ **Pappan K, Austin-Brown S, Chapman KD, Wang X.** (1998) Substrate selectivities and lipid modulation of plant phospholipase D alpha, -beta, and -gamma. *Arch Biochem Biophys.* 353(1):131-40.
- ✓ **Paria BC, Deutsch DD, Dey SK.** (1996) The uterus is a potential site for anandamide synthesis and hydrolysis: differential profiles of anandamide synthase and hydrolase activities in the mouse uterus during the periimplantation period. *Mol Reprod Dev.* 45(2):183-92.
- ✓ **Paria BC and Dey SK.** (2000) Ligand-receptor signaling with endocannabinoids in preimplantation embryo development and implantation. *Chem Phys Lipids.* 108(1-2):211-20.
- ✓ **Paria BC, Huet-Hudson YM, Dey SK.** (1993) Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90(21):10159-62.
- ✓ **Penfield S, Li Y, Gilday AD, Graham S, Graham IA.** (2006) *Arabidopsis* ABA INSENSITIVE4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm. *Plant Cell.* 18(8):1887-99.
- ✓ **Pertwee RG.** (2001) Cannabinoid receptors and pain. *Prog Neurobiol.* 63(5):569-611.
- ✓ **Pestonjamas VK and Burstein SH.** (1998) Anandamide synthesis is induced by arachidonate mobilizing agonists in cells of the immune system. *Biochim Biophys Acta.* 1394(2-3):249-60.
- ✓ **Petersen G, Chapman KD, Hansen HS.** (2000) A rapid phospholipase D assay using zirconium precipitation of anionic substrate phospholipids: application to N-acyl ethanolamine formation *in vitro*. *J Lipid Res.* 41(9):1532-8.
- ✓ **Phillips TA, VanBogelen RA, Neidhardt FC.** (1984) lon gene product of *Escherichia coli* is a heat-shock protein. *J Bacteriol.* 159(1):283-7.
- ✓ **Pritchard SL, Charlton WL, Baker A, Graham IA.** (2002) Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. *Plant J.* 31(5):639-47.

Q/R

- ✓ **Qin W, Pappan K, Wang X.** (1997) Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD). Cloning of PLD gamma and regulation of plant PLD gamma, -beta, and -alpha by polyphosphoinositides and calcium. *J Biol Chem.* 272(45):28267-73.
- ✓ **Quettier AL, Shaw E, Eastmond PJ.** (2008) SUGAR-DEPENDENT6 encodes a mitochondrial flavin adenine dinucleotide-dependent glycerol-3-p dehydrogenase, which is required for glycerol catabolism and post germinative seedling growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 148(1):519-28.
- ✓ **Randall MD and Kendall DA.** (1998) Anandamide and endothelium-derived hyperpolarizing factor act *via* a common vasorelaxant mechanism in rat mesentery. *Eur J Pharmacol.* 346(1):51-3.
- ✓ **Rando RR.** (2002) Membrane-bound lecithin-retinol acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun.* 292(5):1243-50.
- ✓ **Rancé I, Fournier J, Esquerré-Tugayé MT.** (1998) The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(11):6554-9.
- ✓ **Rawlyer AJ and Braendle RA.** (2001) N-Acylphosphatidylethanolamine accumulation in potato cells upon energy shortage caused by anoxia or respiratory inhibitors. *Plant Physiol.* 127(1):240-51.
- ✓ **Reddy PV, Schmid PC, Natarajan V, Muramatsu T, Schmid HH.** (1984) Properties of canine myocardial phosphatidylethanolamine N-acyltransferase. *Biochim Biophys Acta.* 795(1):130-6.
- ✓ **Reichert AI, He XZ, Dixon RA.** (2009) Phenylalanine ammonia-lyase from tobacco (*Nicotiana tabacum*)-characterization of the four tobacco PAL genes and active heterotetrameric enzymes. *Biochem J.*
- ✓ **Ritchie S and Gilroy S.** (2000) Absciscic acid stimulation of phospholipase D in the barley aleurone is G-protein-mediated and localized to the plasma membrane. *Plant Physiol.* 124(2):693-702.
- ✓ **Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Gómez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodríguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D.** (2001) An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature.* 414(6860):209-12.

- ✓ **Rosahl S.** (1996) Lipoxygenases in plants--their role in development and stress response. *Z Naturforsch C.* 51(3-4):123-38.
- ✓ **Roughan, P.G, Slack, C.R, Holland, R.** (1978) Generation of phospholipid artifacts during extraction of developing soybean seeds with methanolic solvents; *Lipids* 13, 497-503.
- ✓ **Rustérucci C, Montillet JL, Agnel JP, Battesti C, Alonso B, Knoll A, Bessoule JJ, Etienne P, Suty L, Blein JP, Triantaphylidès C.** (1999) Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *J Biol Chem.* 1999 Dec 17;274(51):36446-55.
- ✓ **Ryu SB, Karlsson BH, Ozgen M, Palta JP.** (1997) Inhibition of phospholipase D by lysophosphatidylethanolamine, a lipid-derived senescence retardant. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(23):12717-2.

S

- ✓ **Sandoval JA, Huang ZH, Garrett DC, Gage DA, Chapman KD.** (1995) N-acylphosphatidylethanolamine in dry and imbibing cottonseeds. Amounts, molecular species, and enzymatic synthesis. *Plant Physiol.* 109(1):269-75.
- ✓ **Sang Y, Zheng S, Li W, Huang B, Wang X.** (2001) Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase D alpha. *Plant J.* 28(2):135-44.
- ✓ **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology.* 24:104-8.
- ✓ **Sarker KP, Obara S, Nakata M, Kitajima I, Maruyama I.** (2000) Anandamide induces apoptosis of PC-12 cells: involvement of superoxide and caspase-3. *FEBS Lett.* 472(1):39-44.
- ✓ **Schmid HH.** (2000) Pathways and mechanisms of N-acylethanolamine biosynthesis: can anandamide be generated selectively? *Chem Phys Lipids.* 108(1-2):71-87.
- ✓ **Schmid HH, Schmid PC, Natarajan V.** (1990) N-acylated glycerophospholipids and their derivatives. *Prog Lipid Res.* 29(1):1-43.
- ✓ **Schmid HH, Schmid PC, Natarajan V.** (1996a) The N-acylation-phosphodiesterase pathway and cell signalling. *Chem Phys Lipids.* 80(1-2):133-42.
- ✓ **Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Scholkopf B, Weigel D, Lohmann JU.** (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet.* 37(5):501-6.

- ✓ **Schmid PC, Krebsbach RJ, Perry SR, Dettmer TM, Maasson JL, Schmid HH.** (1995) Occurrence and postmortem generation of anandamide and other long-chain N-acylethanolamines in mammalian brain. *FEBS Lett.* 375(1-2):117-20.
- ✓ **Schmid PC, Paria BC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Dey SK.** (1997) Changes in anandamide levels in mouse uterus are associated with uterine receptivity for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(8):4188-92.
- ✓ **Schmid PC, Reddy PV, Natarajan V, Schmid HH.** (1983) Metabolism of N-acylethanolamine phospholipids by a mammalian phosphodiesterase of the phospholipase D type. *J Biol Chem.* 258(15):9302-6.
- ✓ **Schmid PC, Zuzarte-Augustin ML, Schmid HH.** (1985) Properties of rat liver N-acylethanolamine amidohydrolase. *J Biol Chem.* 260(26):14145-9.
- ✓ **Schwacke R, Schneider A, van der Graaff E, Fischer K, Catoni E, Desimone M, Frommer WB, Flügge UI, Kunze R.** (2003) ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol.* 131(1):16-26.
- ✓ **Sepe N, De Petrocellis L, Montanaro F, Cimino G, Di Marzo V.** (1998) Bioactive long chain N-acylethanolamines in five species of edible bivalve molluscs. Possible implications for mollusc physiology and sea food industry. *Biochim Biophys Acta.* 1389(2):101-11.
- ✓ **Shi YQ, Hubacek I, Rando RR.** (1993) Kinetic mechanism of lecithin retinol acyl transferase. *Biochemistry.* 32(5):1257-63.
- ✓ **Shrestha R, Dixon RA, Chapman KD.** (2003) Molecular identification of a functional homologue of the mammalian fatty acid amide hydrolase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.* 278(37):34990-7.
- ✓ **Shrestha R, Noordermeer MA, Van der Stelt M, Veldink GA, Chapman KD.** (2002) N-acylethanolamines are metabolized by lipoxygenase and amidohydrolase in competing pathways during cottonseed imbibition. *Plant Physiol.* 130(1):391-401.
- ✓ **Simon GM and Cravatt BF.** (2006) Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem.* 281(36):26465-72.
- ✓ **Simon GM and Cravatt BF.** (2008) Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain. *J Biol Chem.* 283(14):9341-9.
- ✓ **Simons K and Ikonen E.** (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387(6633):569-72.
- ✓ **Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A.** (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* 6:175-82.

- ✓ **Sorger D and Daum G.** (2002) Synthesis of triacylglycerols by the acyl-coenzyme A:diacylglycerol acyltransférase Dga1p in lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 184(2):519-24.
- ✓ **Stalberg K, Neal AC, Ronne H, Stahl U.** (2008) Identification of a novel GPCAT activity and a new pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in *S. cerevisiae*. J Lipid Res. 49(8):1794-806.
- ✓ **Stefanis L, Park DS, Friedman WJ, Greene LA.** (1999) Caspase-dependent and -independent death of camptothecin-treated embryonic cortical neurons. J Neurosci. 19(15):6235-47.
- ✓ **Stenzel I, Ischebeck T, König S, Hołubowska A, Sporysz M, Hause B, Heilmann I.** (2008) The type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 3 is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell. 20(1):124-41.
- ✓ **Strahl T and Thorner J.** (2007) Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim Biophys Acta. 1771(3):353-404.
- ✓ **Straiker A, Stella N, Piomelli D, Mackie K, Karten HJ, Maguire G.** (1999) Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. Proc Natl Acad Sci USA. 96(25):14565-70.
- ✓ **Studier FW and Moffatt BA.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol. 189(1):113-30.
- ✓ **Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW.** (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol. 185:60-89.
- ✓ **Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Tonegawa T, Nakane S, Yamashita A, Waku K.** (1996a) Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca⁽²⁺⁾-dependent transacylase and phosphodiesterase activities. Biochem Biophys Res Commun. 218(1):113-7.
- ✓ **Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Tonegawa T, Nakane S, Yamashita A, Ishima Y, Waku K.** (1996b) Transacylase-mediated and phosphodiesterase-mediated synthesis of N-arachidonylethanolamine, an endogenous cannabinoid-receptor ligand, in rat brain microsomes. Comparison with synthesis from free arachidonic acid and ethanolamine. Eur J Biochem. 240(1):53-62.
- ✓ **Sun YX, Tsuboi K, Okamoto Y, Tonai T, Murakami M, Kudo I, Ueda N.** (2004) Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. Biochem J. 380(Pt 3):749-56.

T

- ✓ **Teaster ND, Motes CM, Tang Y, Wiant WC, Cotter MQ, Wang YS, Kilaru A, Venables BJ, Hasenstein KH, Gonzalez G, Blancaflor EB, Chapman KD.** (2007) N-Acylethanolamine metabolism interacts with abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell*. 19(8):2454-69.
- ✓ **Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C.** (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(10):4158-63.
- ✓ **Terrazzino S, Berto F, Dalle Carbonare M, Fabris M, Guiotto A, Bernardini D, Leon A.** (2004) Stearoyl-ethanolamide exerts anorexic effects in mice *via* down-regulation of liver stearyl-coenzyme A desaturase-1 mRNA expression. *FASEB J*. 18(13):1580-2.
- ✓ **Testet E, Akermoun M, Shimoji M, Cassagne C, Bessoule JJ.** (2002) Nonenzymatic synthesis of glycerolipids catalyzed by imidazole. *J Lipid Res*. 43(7):1150-4.
- ✓ **Testet E, Bessoule JJ, Mongrand S, Guillot-Salomon T, Cantrel C, Cassagne C.** (1996) Occurrence of an acyl-CoA:1-acylglycerophosphorylcholine acyltransferase in plant mitochondria. *FEBS Lett*. 399(1-2):87-91.
- ✓ **Testet E, Laroche-Traineau J, Noubhani A, Coulon D, Bunoust O, Camougrand N, Manon S, Lessire R, Bessoule JJ.** (2005) YPR140wp, 'the yeast tafazzin', displays a mitochondrial lysophosphatidylcholine (lyso-PC) acyltransferase activity related to triacylglycerol and mitochondrial lipid synthesis. *Biochem J*. 387(3):617-26.
- ✓ **Testet E, Verdoni N, Cassagne C, Bessoule J.** (1999) Transfer and subsequent metabolism of lysolipids studied by immobilizing subcellular compartments in alginate beads. *Biochim Biophys Acta*. 1440(1):73-80.
- ✓ **Thompson JD, Higgins DG, Gibson.** (1994) TJ.CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 22(22):4673-80.
- ✓ **Tijburg LB, Geelen MJ, Van Golde LM.** (1989) Biosynthesis of phosphatidylethanolamine *via* the CDP-ethanolamine route is an important pathway in isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 160(3):1275-80.
- ✓ **Tillman TS and Bell RM.** (1986) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase; Simultaneous loss of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase indicates a common gene. *J Biol Chem*. 261(20):9144-9.

- ✓ **Tripathy S, Kleppinger-Sparace K, Dixon RA, Chapman KD.** (2003) N-acylethanolamine signaling in tobacco is mediated by a membrane-associated, high-affinity binding protein. *Plant Physiol.* 131(4):1781-91.
- ✓ **Tripathy S, Venables BJ, Chapman KD.** (1999) N-Acylethanolamines in signal transduction of elicitor perception. Attenuation of alkalization response and activation of defense gene expression. *Plant Physiol.* 121(4):1299-308.
- ✓ **Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM.** (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 83(2):393-411.
- ✓ **Tusnady GE and Simon I.** (1998) Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J Mol Bio.* 283(2), 489-506.

U/V

- ✓ **Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S, Tokunaga T.** (1995) Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J Biol Chem.* 270(40):23823-7.
- ✓ **Umera M, Joseph RA, Steponkus PL.** (1995) Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana* (effects on plasma membrane lipid composition and freeze-induced lesions). *Plant Physiol.* 109(1):15-30.
- ✓ **Van Der Stelt M, Nieuwenhuizen WF, Veldink GA, Vliegthart JF.** (1997) Dioxygenation of N-linoleoyl amides by soybean lipoxygenase-1. *FEBS Lett.* 411(2-3):287-90.
- ✓ **Van Der Stelt M, Noordermeer MA, Kiss T, Van Zadelhoff G, Merghart B, Veldink GA, Vliegthart JF.** (2000) Formation of a new class of oxylipins from N-acyl(ethanol)amines by the lipoxygenase pathway. *Eur J Biochem.* 267(7):2000-7.
- ✓ **Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G.** (1998) Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J.* 12(11):1035-44.
- ✓ **Vellosillo T, Martínez M, López MA, Vicente J, Cascón T, Dolan L, Hamberg M, Castresana C.** (2007) Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell.* 19(3):831-46.

- ✓ **Venables BJ, Waggoner CA, Chapman KD.** (2005) N-acyl ethanolamines in seeds of selected legumes. *Phytochemistry*. 66(16):1913-8.
- ✓ **Vitiello F and Zanetta JP.** (1978) Thin-layer chromatography of phospholipids. *J Chromatogr*. 166(2):637-40.
- ✓ **Von Heijne G.** (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol*. 225(2):487-94.

W

- ✓ **Walker JM, Huang SM, Strangman NM, Tsou K, Sañudo-Peña MC.** (1999) Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96(21):12198-203.
- ✓ **Wang J, Okamoto Y, Morishita J, Tsuboi K, Miyatake A, Ueda N.** (2006) Functional analysis of the purified anandamide-generating phospholipase D as a member of the metallo-beta-lactamase family. *J Biol Chem*. 281(18):12325-35.
- ✓ **Wang J, Paria BC, Dey SK, Armant DR.** (1999) Stage-specific excitation of cannabinoid receptor exhibits differential effects on mouse embryonic development. *Biol Reprod*. 60(4):839-44.
- ✓ **Wang J and Ueda N.** (2009) Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. (2009), doi:10.1016/j.prostaglandins.2008.12.002.
- ✓ **Wang X.** (2001) Multiple forms of phospholipase D in plants: the gene family, catalytic and regulatory properties, and cellular functions. *Prog Lipid Res*. 39(2):109-49.
- ✓ **Wang X.** (2002) Phospholipase D in hormonal and stress signaling. *Curr Opin Plant Biol*. 5(5):408-14.
- ✓ **Wang X.** (2005) Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development and stress responses. *Plant Phys*. 139:566–73.
- ✓ **Wang XM and Moore TS Jr.** (1991) Phosphatidylethanolamine synthesis by castor bean endosperm. Intracellular distribution and characteristics of CTP: ethanolaminephosphate cytidyltransferase. *J Biol Chem*. 266(30):19981-7.
- ✓ **Wang YS, Shrestha R, Kilaru A, Wiant W, Venables BJ, Chapman KD, Blancaflor EB.** (2006) Manipulation of *Arabidopsis* fatty acid amide hydrolase expression modifies plant growth and sensitivity to N-acyl ethanolamines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103(32):12197-202.

- ✓ **Wei BQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES, Cravatt BF.** (2006) A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J Biol Chem.* 281(48):36569-78.
- ✓ **Weier D, Müller C, Gaspers C, Frentzen M.** (2005) Characterisation of acyltransferase from *Synechocystis* sp PCC6803. *Biochem Biophys Res Commun.* 334(4):1127-34.
- ✓ **Wilson RF and Rinne RW.** (1974) Phospholipids in the developing soybean seed. *Plant Physiol.* 54(5):744-47.

X

- ✓ **Xing T, Higgins VJ, Blumwald E.** (1996) Regulation of plant defense response to fungal pathogens: two types of protein kinases in the reversible phosphorylation of the host plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Cell* 8(3):555-564.
- ✓ **Xing Y, Jia W, Zhang J.** (2009) AtMKK1 and AtMPK6 are involved in abscisic acid and sugar signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Mol Biol.* 70(6):725-36.

Y

- ✓ **Yamashita A, Nakanishi H, Suzuki H, Kamata R, Tanaka K, Waku K, Sugiura T.** (2007) Topology of acyltransferase motifs and substrate specificity and accessibility in 1-acyl-sn-glycero-3-phosphate acyltransferase 1. *Biochim Biophys Acta.* 1771(9):1202-15.
- ✓ **Yang HY, Karoum F, Felder C, Badger H, Wang TC, Markey SP.** (1999) GC/MS analysis of anandamide and quantification of N-arachidonoylphosphatidylethanolamides in various brain regions, spinal cord, testis, and spleen of the rat. *J Neurochem.* 72(5):1959-68.
- ✓ **Yu C, Kennedy NJ, Chang CC, Rothblatt JA.** (1996) Molecular cloning and characterization of two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* acyl-CoA:sterol acyltransferase. *J Biol Chem.* 271(39):24157-63.

Z

- ✓ **Zalejski C, Paradis S, Maldiney R, Habricot Y, Miginiac E, Rona JP, Jeannette E.** (2006) Induction of abscisic acid-regulated gene expression by diacylglycerol

- pyrophosphate involves Ca^{2+} and anion currents in *Arabidopsis* suspension cells. Plant Physiol. 141(4):1555-62.
- ✓ **Zalejski C, Zhang Z, Quettier AL, Maldiney R, Bonnet M, Brault M, Demandre C, Miginiac E, Rona JP, Sotta B, Jeannette E.** (2005) Diacylglycerol pyrophosphate is a second messenger of abscisic acid signaling in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. Plant J. 42(2):145-52.
 - ✓ **Zhang Y, Guo WM, Chen SM, Han L, Li ZM.** (2007) The role of N-lauroylethanolamine in the regulation of senescence of cut carnations (*Dianthus caryophyllus*). J Plant Physiol. 164(8):993-1001.
 - ✓ **Zhang Y, Wang L, Liu Y, Zhang Q, Wei Q, Zhang W.** (2006) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na^+/H^+ antiport in the tonoplast. Planta. 224(3):545-55.
 - ✓ **Zheng Z and Zou J.** (2001) The initial step of the glycerolipid pathway: identification of glycerol-3-phosphate/dihydroxyacetone phosphate dual substrate acyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem. 276(45):41710-6.
 - ✓ **Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W.** (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. Plant Physiol. 36(1):2621-32.
 - ✓ **Ziylan YZ, Baltaci AK, Mogulkoc R.** (2009) Leptin transport in the central nervous system. Cell Biochem Funct. 27(2):63-70.
 - ✓ **Zweytick D, Athenstaedt K, Daum G.** (2000). Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. Biochim Biophys Acta. 1496(2):101-20.

PARTIE VII

ANNEXES

Annexes

Annexe. 1 :

Séquence de l'ADNc de la séquence At1g78690

```
>At1g78690
ATGGGGAAGATAATGGAATGGGCGACGAAGATCTGATCATTGGGAGGAATTCCAAGGAATACTGTGATAA
TGGCTGTTAGTGCATTTCGAAAAGCAGTAGCAAATCTTTGCAATAAAAGCTCAGTTCACAAATGCAGATAC
TCTTATGAATCTTGTCCAGTCAAGACCACCTGGTGTCTCTCATCACTGTTAGTAATCACATGTCGACT
TTGGATGATCCAGTAATGTGGGGGGCATTAAAGGGTCTCCTTTCCCTTAGATCCAGAATTGGCTCGGTGGG
TTCTTGCTGCAGAGGATATATGTTTCAGGAACCCATATTTCTCCTACATTTCCGCACTGGAAAATGTAT
ACCTATAACTAGAGGTGGTGGAAATCTACCAAGAAAACATGAATGAAGCTCTCCAGCGATTAAAAGATGGA
TCTTGGCTGCATACCTTCCCAGAGGGGAAAGGTGTTTCAAGATGATGTTCCCTATAAGACGACTTAAATGGG
GAACTGCAAGCCTCATCGCCGTTCCCAAGTTACCCCAATCGTTTGCCTAATAATCACCGTGGTTTGA
GGAGATGATGCCGAGAACTACAATAATGGACGAAAGACCACTGGTACCGTTGCCGAACAAACACCTTAAA
GTTGTGGTGGTGAACCAATTGAGTTTGTATGTTCCAATGATGGTTGAGACTGCTGTCTTGGACTCCCGCC
ATGTAACCCCTCCTCTTCAAGAAGTGAAATGGCCTGTCTCCTCATTCTGCTGGCCAGTGCTAGACGAAAC
TGCTCAGAGACACCTCTACATAGCTCTGTCCGAGAAGATTCAATCCTCCTTGGAAACATTGAGACTCTTA
GCCAAGCGGTGTGA
```

Annexe. 2 :

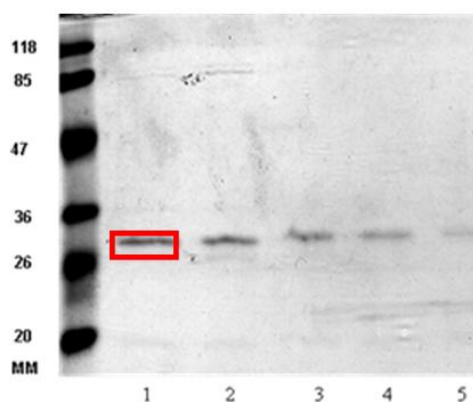
Séquence de l'ADN génomique de la séquence At1g78690. En bleu les exons, en noir les introns. Taille de la séquence : 3721pb : premier exon (1855-2063), deuxième exon (2169-2299), troisième exon (2478-2563), quatrième exon (2645-2782) et cinquième exon (2972-3262).

```
>At1g78690
ttattatcatcgggttctctctgctttctgatatgaattgtccttatttccagtttgggtatctcaccacaa
agcttttgaaggaaatattgtctctgtctaatttctttaaattgtcacaaacatgctgtgatgacaacggca
aggtatttttatgtccccagaatacctaaaaagattcaatagcctgtgaccttatagaccaaactctatt
aaaacatatatccaggtttatgtttcaacagttcaatcaacaaaatatccagtgaacgggttccagtggtc
atcctgaggtatatatacagtcacaaggttaactttacgtctctcatttagtctttcacgcctaggcattg
tcattgtggtccactgcggtatcctatcctattaaagaaaatctctgtactatactctgcagaaaaat
gcattcgagtgaggatcatctaaaattccacactctgaggacgcgatccaggtgactcagcacgcccga
atcatctagtcaggttagttctctatccatttttttgaataaattgataagagagtgacccaactctgat
tgctacattagaatcagataaactgagagttggttagatcatgaagtagtcatggatcgtggttgaatgt
gatgcagtgagctaggaagtcactgaacagaccagagctcaagaaagtgcagcaatctcattttacaa
ctataagcctacttactgtggaatgcagggtaaagccactctgacaatctttacataattctctctctct
tcgtctctctctttttcttcaagttttaaagattcttaggatcgaataaaatggtggattttgcagga
ttgggtacgcagaggtttacatcttcacacaacaacgatcccttctctaataactataacctctcctgtg
tatcctctcgtgtgtatagtgaatattgtaccttcgactctgttattatctgtgaacttgttgaacttt
gaacgtcagcctatggcttgtgtttgacattaaactagataatgtacgctttctatctttagtctaatt
cataaaacaaaacaaaagcttatatatgtttactcactattaataagataatgaatctatgtttgtta
cataaaactttgtcatttataataaataatgtgatctgtctgtttcatgacattttataagattcgagtt
ctggtttttcattcaattggttaacctgttctctagaaatttacagtttctttacatggttatagttgttaca
taaaatgatcattacaagaataatattgttgggcttagttaaattttaatatatgggcccataatatat
ctatatgttgggtcccaaaaatccctatggcctgataacaaaattgaatggtcttcattgccaaccgaca
gacagagtcgtgactagcaaaacttcccggtttattattcctttaaaccgaaatataaccagccaaattcgac
tgttcttcatcgatttgactgtgtgtttctctctcgatgaattcctcccaagcaagcttcttcgactt
ccctctaaccaccaatcgtctggtctcgttttctaattgtaagtcttctccttctctaagttttgtttcag
tgtcaatgtagatcttcttaggtggaatcaagtaaaagagattgataaacctaatgttccgttctatc
gttaaaactttcctagatttagtcgggttaggaaacgaagtcagctatgaaaccgttgcatcgaatttt
gtcatagatatgataatttccggttcgcacatcagaaccggccctgtatgcaagtagcttgaggttctgt
tataattttgttgaaggagagaaacttgaagctaATGGGGAAGATAATGGAATGGGCGACGAAGATCTGAT
CATTGGGAGGAATCCAAGGAATACTGTGATAATGGCTGTTAGTGCATTTCGAAAAGCAGTAGCAAATC
TTTGCATAAAAGCTCAGTTCACAATGCAGATACTCTTATGAATCTTGTCCAGTCAAGACCACCTGGTGT
TCCTCTCATCACTGTTAGTAATCACATGTCGACgttagttaataataaaacttaatagtatgatccctt
cttcatgtcatctcttccactcatttgtgtttttgatgttgatttatcttcttgttgtgtaacagTT
TGGATGATCCAGTAATGTGGGGGCATTAAAGGGTCTCCTTTCCCTTAGATCCAGAATTGGCTCGGTGGGT
TCTTGGCTGCAGAGGATATATGTTTCAGGAACCCATATATTCTCCTACATTTTCCGCACTGgtatgtcactt
tcttcttcttctgtctctctcttgggaaagactgtaacagtgatttgttcttgtttgtatggatttg
gactgtatcacaacttttttagtagatttgggtgattgccttcttaacaaaataggattttctcatga
tgcatgttagtgatttcttttgagcagGAAAATGTATACCTATAACTAGAGGTGGTGGAACTACCAAGA
AAACATGAATGAAGCTCTCCAGCGATTAAAAGATGGATCTTGGgtatgttatcttgcacctttaaactaa
ttgtacttagactttttagacctctgacctttggatttaaccatgactagtagTGCATACCTCCGAG
AGGGAAGGTGTTTCAAGATGATGTTCTTATAAGACGACTTAAATGGGGAAGTGAAGCCTCATCGCCG
TTCCCAAGTTACCCCAATCGTTTGGCAATAATCACCGTGGTTTGGAGAGgtaactcgtccaggtccc
ttctaagctcgttcaactcaaatcgtttaaacttcgatagctaaatgtctgcgggaaagagaaaaagc
```

catgaattatgtatccattttccaaacttcgaatttctgcttgatagtattattatgtcttcattcgaag
 gtcacttaccacattgtgtgaacggcttagATGATGCCGGAGAACTACAATAATGGACGAAGACCACTG
 GTACCGTTTGCCGAACAAACACCTTAAAGTTGTGGTTGGTGAACCAATTGAGTTTGATGTCCAATGATGG
 TTGAGACTGCTGCTTGGACTCCCGCCATGTAACCCCTCCTCTTCAAGAAGTGAATGGCCTGTCCTCAC
 TTCTGCTGGCCAAGTGTAGACGAACTGCTCAGAGACACCTCTACATAGCTCTGTCCGAGAAGATTCAA
 TCCTCCTTGGAACATTGAGACTCTTAGCCAAGCGGTTGTGActtccgcccggaaacttcataatcaaaat
 ccggttcacaacttttaaaagttccggttagattcgccatggttaataatattatctttattcaatttc
 ctgaagctgagaaaaaattatataactatgaaaaatttaataactcgcatTTTAAATTATTTATCGACTA
 ggatatatagcaacccgcaataatgtatgttgtgaaatgttatatcttatcaatatcttatgattatag
 caagatttcagtgaaaaacctaacaacaaaaaaagatttcagtgaaaaactTTTTTTTTTTTcagtgaaa
 acttaaaaagcgacaataatcgaatataagcatcaacaaaataataacaagaccgttatttgtgtgatg
 tctgtaacgctgatgatctggccagttctgtcttctgtctgatgatgttgacagaaacagcattaaacg
 accagtttga

Annexe 3 :

Analyse par spectrométrie de masse de la protéine enrichie par ÄKTAexplorer et isolée par SDS-PAGE :



Analyse lf081024_01

	Identification	# MS/MS scan	# distinct pep	% coverage	MW	Relative Abundance
1	splP77398 ARNA_ECOLI Bifunctional polymyxin resistance protein arnA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=arnA PE=1 SV=1	3	3	7.42	74288.4	
2	splP36548 AMIA_ECOLI Probable N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase amiA OS=Escherichia coli (strain K12) GN=amiA PE=3 SV=1	14	9	45.33	31411.9	
3	splP32664 NUDC_ECOLI NADH pyrophosphatase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=nudC PE=1 SV=2	5	5	27.63	29688.7	
4	splP37051 PURU_ECOLI Formyltetrahydrofolate deformylase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=purU PE=1 SV=1	12	4	24.64	31934.5	
5	splP02925 RBSB_ECOLI D-ribose-binding periplasmic protein OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rbsB PE=1 SV=1	3	3	14.19	30950.2	
6	splP0A9K9 SLYD_ECOLI FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase slyD OS=Escherichia coli (strain K12) GN=slyD PE=1 SV=1	4	3	22.45	20852.7	
7	splP0A7V0 RS2_ECOLI 30S ribosomal protein S2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsB PE=1 SV=2	11	5	20.33	26743.5	

8	splP36999 RRMA_ECOLI Ribosomal RNA large subunit methyltransferase A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rrmA PE=1 SV=1	5	4	18.59	30418.7	
9	splP0AA43 RSUA_ECOLI Ribosomal small subunit pseudouridine synthase A OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rsuA PE=1 SV=1	2	2	13.42	25865.1	
10	splP0A6X3 HFQ_ECOLI Protein hfq OS=Escherichia coli (strain K12) GN=hfq PE=1 SV=2	2	2	22.55	11166.3	
11	AT1G78690.1_Symbols_phospholipid/glycerol_acyltransferase_family_protein_chr1_29601895-29603302_FORWARD	6	5	21.13	31742.8	
12	splP0A7V3 RS3_ECOLI 30S ribosomal protein S3 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rpsC PE=1 SV=2	7	5	35.19	25983.0	
13	splP60422 RL2_ECOLI 50S ribosomal protein L2 OS=Escherichia coli (strain K12) GN=rplB PE=1 SV=2	5	4	23.08	29860.2	
14	splP0AC41 DHSA_ECOLI Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit OS=Escherichia coli (strain K12) GN=sdhA PE=1 SV=1	6	4	7.82	64421.5	
15	splP16528 ICLR_ECOLI Acetate operon repressor OS=Escherichia coli (strain K12) GN=iclR PE=1 SV=1	6	4	16.42	29739.1	
16	splP0A8I5 TRMB_ECOLI tRNA (guanine-N(7))-methyltransferase OS=Escherichia coli (strain K12) GN=trmB PE=1 SV=1	3	3	14.64	27307.2	
17	splP0ACL0 GLPR_ECOLI Glycerol-3-phosphate regulon repressor OS=Escherichia coli (strain K12) GN=glpR PE=1 SV=1	3	3	19.84	28047.6	

PARTIE VIII

PUBLICATION ET COMMUNICATIONS

Publication et communications

Publication :

- Faure L., Coulon D., Laroche-Traineau J., Le Guédard M., Schmitter J.M., Testet E., Lessire R., Bessoule J.J. Discovery and Characterisation of an *Arabidopsis thaliana* N-Acylphosphatidylethanolamine Synthase. (2009) J Biol Chem. 284(28):18734-41.

Communications orales :

- Faure L., Coulon D., Laroche-Traineau J., M., Schmitter J.M., Lessire R., Bessoule J.J. Functional characterisation of a new Acyltransferase involved in the synthesis of a cellular signaling lipid. 6^{ème} Congrès Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biologie Végétale (SFVB), juillet 2008, Tours (France).
- Faure L., Coulon D., Laroche-Traineau J., Schmitter J.M., Lessire R., Bessoule J.J. Identification and characterization of a NAPE synthase from *A. thaliana*. 18th International Symposium on Plant Lipids (ISPL), July 2008 Bordeaux (France).

Communications par affiches :

- Faure L., Coulon D., Laroche-Traineau J., Le Guédard M., Schmitter J.M., Lessire R., Bessoule J.J. NAE metabolism: Identification and characterisation of the first N-acylphosphatidylethanolamine synthase in *Arabidopsis thaliana*. 8^{ème} Journée Scientifiques de l'Ecole Doctorale des Sciences Biologiques de Bordeaux2, Avril 2008, Arcachon (France).
- Faure L., Coulon D., Laroche-Traineau J., Le Guédard M., Schmitter J.M., Lessire R., Bessoule J.J. Identification and characterisation of a NAPE synthase from *A. thaliana*. 18th International Symposium on Plant Lipids (ISPL), July 2008 Bordeaux (France).
- Faure L., Coulon D., Laroche-Traineau J., Le Guédard M., Schmitter J.M., Lessire R., Bessoule J.J. Métabolisme des NAE : identification et caractérisation de la première N-acylphosphatidyléthanolamine synthase chez *A. thaliana* ; 9^{ème} Journée Scientifiques de l'Ecole Doctorale des Sciences Biologiques de Bordeaux2, Avril 2009, Arcachon (France).
- Faure L., Coulon D., Laroche-Traineau J., Le Guédard M., Schmitter J.M., Lessire R., Bessoule J.J. Discovery and characterisation of an *A. thaliana* NAPE synthase potentially involved in NAE oxylipin pathway. Regulatory Oxylipins an International Symposium, June 2009 (Lausanne, Switzerland).

Résumé/Summary

Identification et caractérisation de la première N-acylphosphatidyléthanolamine synthase chez *A. thaliana*.

Les N-acylphosphatidyléthanolamines (NAPE) sont des phospholipides complexes peu abondants au sein des membranes biologiques mais largement répandues dans différents organismes. Outre ses fonctions de stabilisation des membranes ce lipide est davantage connu pour être le précurseur des N-acyléthanolamines (NAE) qui sont impliquées dans de très nombreuses voies de signalisation chez les plantes (lors de la germination, du développement racinaire, de l'induction de gène de défense, etc.) comme chez les animaux (apoptose, ligand des récepteurs endocannabinoïdes, notion de satiété, etc.).

Au début de ma thèse, les gènes codant pour les enzymes impliquées dans les différentes étapes de la voie métabolique des NAE (e.g NAPE-PLD, FAAH1 et 2) ont été caractérisées exceptées le ou les gène(s) codant pour l'enzyme catalysant la synthèse de NAPE précurseurs de ces lipides.

Une étude bioinformatique a permis d'identifier de nouvelles séquences codantes pour des acyltransférases putatives chez *A. thaliana* dont celle du gène At1g78690. La caractérisation fonctionnelle de cette enzyme a été déterminée après son expression hétérologue chez *E.coli* sur fractions membranaires et protéines purifiées. Puis le profil d'expression génique, la localisation cellulaire de la protéine ainsi que son activité ont été étudiés chez les plantes à partir notamment de mutants d'*A. thaliana* (ADN-T et « 35S »). Les résultats obtenus au cours de cette étude ont permis d'identifier et de caractériser la première NAPE synthase chez les plantes.

Mots clés : N-acylphosphatidyléthanolamine synthase (NAPE synthase), N-acyléthanolamine (NAE), *Arabidopsis*, Signalisation.

Discovery and characterization of an *A. thaliana* N-acylphosphatidylethanolamine synthase.

N-acylphosphatidylethanolamine (NAPE) is a widespread, albeit minor, membrane phospholipid in various organisms. Besides its stabilizing properties to membranes bilayers, NAPE is known to be the precursor for N-acylethanolamine (NAE) synthesis. NAE have been shown to regulate a variety of physiological functions in both plants (germination, root development, gene induction, etc.) and animals (apoptosis, ligand for cannabinoid receptors, satiety properties, etc.)

At the beginning of my PhD, the genes encoding the enzymes involved in the different steps of NAE metabolism were well characterized (e.g NAPE-PLD, FAAH 1 and 2), with the exception of the NAPE synthase gene(s).

A bioinformatic study allowed the identification of coding sequences for putative new acyltransferases in *A. thaliana*, such as the At1g78690 gene. After expression in *E. coli*, the functional characterization of At1g78690p was carried out by analyses of the lipid content and by enzymatic assays using membrane fractions or purified proteins. The localisation of the protein and its activity were also studied in *A. thaliana* mutants (ADN-T and "35S"). This study shows the identification and characterization of the first NAPE-synthase in plants.

Keywords: N-acylphosphatidylethanolamine synthase (NAPE-synthase), N-acylethanolamine (NAE), *Arabidopsis*, Signaling.