

ANNEE 2010

N° 53

THESE

pour le

**DIPLÔME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

par

Antoine BAUDRY

présentée et soutenue publiquement le 11 octobre 2010

<p>La Régulation du Métabolisme Secondaire chez les Plantes : Exemple de la Biosynthèse des Flavonoïdes.</p>

Président :

M. Yves-François POUCHUS,
Professeur de Botanique et Cryptogamie

Membres du Jury :

M. Jean-François BIARD,
Professeur de Physiologie Végétale et Pharmacognosie
M. Thomas DEJOIE,
Praticien Hospitalier, Service de Biochimie

Table des Matières

1	INTERET DE L'ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES ET PRESENTATION DE LA THESE	- 6 -
1.1	INTERET FONDAMENTAL	- 6 -
1.2	INTERET BIOTECHNOLOGIQUE	- 7 -
1.3	OBJECTIFS DE LA THESE ET PRESENTATION DU MEMOIRE	- 7 -
2	GENERALITES SUR LES COMPOSES FLAVONOÏQUES	- 9 -
2.1	LES FLAVONOÏDES CHEZ LES VEGETAUX	- 9 -
2.1.1	<i>Structure des flavonoïdes</i>	- 9 -
2.1.2	<i>Fonctions des flavonoïdes chez les végétaux</i>	- 10 -
2.2	IMPORTANCE DES FLAVONOÏDES EN NUTRITION HUMAINE ET ANIMALE.....	- 13 -
2.2.1	<i>Intérêt des flavonoïdes en alimentation humaine</i>	- 13 -
2.2.2	<i>Intérêt spécifique des PA en alimentation animale</i>	- 17 -
3	LA BIOSYNTHESE DES PA CHEZ ARABIDOPSIS THALIANA	- 19 -
3.1	METHODE D'ETUDE.....	- 19 -
3.2	BIOCHIMIE DE LA SYNTHÈSE DES PA.....	- 20 -
3.2.1	<i>Généralités</i>	- 20 -
3.2.2	<i>Caractéristiques des enzymes communes à plusieurs voies de biosynthèse des flavonoïdes</i> ...	- 23 -
3.2.3	<i>Caractéristiques des enzymes spécifiques de la biosynthèse des PA</i>	- 25 -
3.2.4	<i>Autres étapes de la biosynthèse des PA</i>	- 27 -
3.2.5	<i>Localisation de la voie de biosynthèse des PA</i>	- 28 -
3.3	LA REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES PA.....	- 31 -
3.3.1	<i>Généralités</i>	- 31 -
3.3.2	<i>Les régulateurs spécifiques</i>	- 31 -
3.3.3	<i>Les régulateurs non spécifiques</i>	- 36 -
3.3.4	<i>La régulation de l'expression de BAN</i>	- 40 -
4	DONNEES FONCTIONNELLES SUR LES PROTEINES MYB ET BHLH REGULANT LA BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES CHEZ LES PLANTES	- 43 -
4.1	GENERALITES SUR LE MODE D'ACTION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION	- 43 -
4.1.1	<i>Introduction</i>	- 43 -
4.1.2	<i>Facteurs de transcription et interactions protéine-protéine</i>	- 43 -
4.1.3	<i>Régulation de l'activité des facteurs de transcription</i>	- 45 -
4.1.4	<i>Régulation de l'abondance des facteurs de transcription</i>	- 45 -
4.1.5	<i>Diffusion des facteurs de transcription chez les plantes</i>	- 46 -
4.2	IMPORTANCE DES FACTEURS MYB ET BHLH CHEZ LES PLANTES.....	- 47 -
4.2.1	<i>Les MYB et les bHLH chez A. thaliana</i>	- 47 -
4.2.2	<i>Propriétés générales des facteurs de transcription de type MYB</i>	- 47 -
4.2.3	<i>Propriétés générales des facteurs de transcription de type bHLH</i>	- 51 -
4.3	LES FACTEURS MYB ET BHLH REGULANT LA BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES	- 53 -
4.3.1	<i>Généralités</i>	- 53 -
4.3.2	<i>L'interaction MYB-bHLH : exemple des facteurs C1 et R de maïs</i>	- 54 -
4.3.3	<i>Différences interspécifiques dans la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes</i>	- 57 -
5	DONNEES FONCTIONNELLES SUR LES PROTEINES A DOMAINE WDR HOMOLOGUES DE TTG1	- 60 -
5.1	GENERALITES SUR LES PROTEINES A DOMAINE WDR	- 60 -
5.2	LES HOMOLOGUES DE TTG1	- 61 -
5.2.1	<i>Analyse phylogénétique des gènes homologues de TTG1</i>	- 61 -
5.2.2	<i>Localisation sub-cellulaire des protéines homologues de TTG1</i>	- 62 -
5.2.3	<i>Interactions de TTG1 et de ses homologues avec les facteurs MYB et bHLH</i>	- 63 -
5.3	LES VOIES DE REGULATION DEPENDANTES DE TTG1 CHEZ A. THALIANA.....	- 63 -
5.3.1	<i>Généralités</i>	- 63 -

5.3.2	<i>Homologie fonctionnelle entre GL1 et WER</i>	- 64 -
5.3.3	<i>Mécanisme de redondance partielle entre les facteurs bHLH dépendants de TTG1</i>	- 65 -
5.4	HYPOTHESES SUR LE MODE D'ACTION DU MODULE MYB-BHLH-WDR	- 66 -
6	ANALYSE DES INTERACTIONS ENTRE TT2, TT8, TTG1 ET LE PROMOTEUR DE BAN	- 68 -
6.1	RESUME DE L'ARTICLE	- 68 -
6.2	INTERPRETATION DES RESULTATS D'INTERACTIONS PROTEINE-PROTEINE ENTRE TT2, TT8 ET TTG1	- 69 -
6.2.1	<i>Interaction entre TT2 et TT8</i>	- 69 -
6.2.2	<i>Interaction entre TT8 et TTG1</i>	- 70 -
6.2.3	<i>Interaction entre TT2 et TTG1</i>	- 71 -
7	ANALYSE DES INTERACTIONS ENTRE TT2, TT8, TTG1 ET LE PROMOTEUR DE TT8	- 73 -
7.1	RESUME DE L'ARTICLE	- 73 -
7.2	COMMENTAIRES SUR LES CIBLES GENETIQUES DU MODULE DE REGULATION TT2-TT8-TTG1	- 88 -
7.3	LES ENZYMES DE BIOSYNTHESE DES PA	- 88 -
7.4	IMPORTANCE DE LA BOUCLE D'AUTO-ACTIVATION REGULANT TT8	- 75 -
8	A LA RECHERCHE DE REGULATEURS NEGATIFS DE LA BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES	- 90 -
8.1	HYPOTHESES SUR L'EXISTENCE DE REGULATEURS NEGATIFS DU MODULE TT2-TT8-TTG1	- 90 -
8.2	CARACTERISATION D'UN REGULATEUR NEGATIF DE LA BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES	- 107 -
8.2.1	<i>Résumé de l'article</i>	- 107 -
9	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	- 109 -
9.1	POURSUITE DE LA CARACTERISATION DES INTERACTIONS ENTRE TT2, TT8 ET TTG1	- 109 -
9.2	RECHERCHE SYSTEMATIQUE DES CIBLES DE TT2, TT8 ET TTG1	- 109 -
9.3	CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE TT8	- 124 -
10	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 126 -

Liste des Figures

Figure 1	Structure chimique des flavonoïdes	p. 11
Figure 2	Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes chez <i>A. thaliana</i>	p. 23
Figure 3	Développement de l'ovule et origine des téguments chez <i>A. thaliana</i>	p. 29
Figure 4	Localisation de la production des PA dans la graine d' <i>A. thaliana</i>	p. 30
Figure 5	Schématisation de l'organisation de la biosynthèse des lignines et des flavonoïdes au niveau de la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique	p. 31
Figure 6	Activité du promoteur de <i>TT2</i> au cours du développement de la graine d' <i>A. thaliana</i>	p. 33
Figure 7	Gènes cibles de <i>TT2</i>	p. 34
Figure 8	Expression de <i>TT1</i> dans les graines d' <i>A. thaliana</i>	p. 35
Figure 9	Analyse de l'expression de <i>TT16</i> chez <i>A. thaliana</i>	p. 37
Figure 10	Expression de <i>TT8</i> chez <i>A. thaliana</i>	p. 38
Figure 11	Expression de <i>TTG1</i> chez <i>A. thaliana</i>	p. 39
Figure 12	Expression de <i>TTG2</i> chez <i>A. thaliana</i>	p. 40
Figure 13	Activité du promoteur de <i>BAN</i> dans les graines d' <i>A. thaliana</i>	p. 41
Figure 14	Activité du promoteur de <i>BAN</i> dans les mutants de régulation de la production des PA	p. 43
Figure 15	Représentation schématique de l'initiation de la transcription des gènes par un enhanceosome chez les eucaryotes	p. 45
Figure 16	Analyse phylogénétique de la famille des facteurs MYB d' <i>A. thaliana</i>	p. 50
Figure 17	Modèle d'action du module MYB-bHLH-WDR	p. 67
Figure 18	Rôle de p300/CBP dans la stimulation de la transcription des gènes régulés par SREBP	p. 103
Figure 19	Comparaison de l'activité des promoteurs de <i>TT2</i> et <i>BAN</i>	p. 104
Figure 20	Comparaison des mécanismes de formation des trichomes et des poils racinaires chez <i>A. thaliana</i>	p. 106

Liste des Tableaux

Tableau 1	Mutants de biosynthèse des PA chez <i>A. thaliana</i>	p. 21
Tableau 2	Protéines à domaine R2R3-MYB caractérisées fonctionnellement chez <i>A. thaliana</i>	p. 49
Tableau 3	Protéines MYB atypiques caractérisées fonctionnellement chez <i>A. thaliana</i>	p. 49
Tableau 4	Protéines à domaine bHLH caractérisées fonctionnellement chez <i>A. thaliana</i>	p. 52
Tableau 5	Régulateurs de la biosynthèse des flavonoïdes chez les plantes	p. 54
Tableau 6	Facteurs MYB et bHLH identifiés dans les voies contrôlées par <i>TTG1</i>	p. 64

Liste des Abréviations et Symboles

aa	acide aminé
ABA	acide abscissique
AD	domaine d'activation de la transcription de GAL4
ADN	acide désoxyribonucléique
ADN-T	acide désoxyribonucléique transféré
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
A, C, G, T	adénosine, cytidine, guanosine, thymidine
ATP	adénosine triphosphate
CHX	cycloheximide
ban	banyuls
BD	domaine de liaison à l'ADN de GAL4
bHLH	« basic Helix-Loop-Helix »
CoA	coenzyme A
DA, kDA	Dalton, kiloDalton
DEX	dexaméthasone
<i>gl</i>	<i>glabra</i>
GUS	β -glucuronidase
GR	récepteur aux glucocorticoïdes des mammifères
MYB	myéloblastose
MYC	myélocarcinose
NADPH	β -nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
§	paragraphe
PA	proanthocyanidines
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
RT	« Reverse Transcription »
SDS	sodium dodécyl sulfate
<i>tds</i>	<i>tannin deficient seed</i>
<i>tt, ttg</i>	<i>transparent testa, transparent testa glabra</i>
UV	ultraviolet

Nomenclature :

BAN	protéine banyuls
<i>BAN</i>	gène banyuls
<i>ban</i>	mutant dans le gène banyuls
<i>TT8:uidA</i>	fusion entre le promoteur de <i>TT8</i> et le gène rapporteur <i>uidA</i>
<i>35S:TT8-GR</i>	fusion traductionnelle entre <i>TT8</i> et <i>GR</i> , exprimée sous la dépendance du promoteur <i>35S</i>

1 INTERET DE L'ETUDE DE LA BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES ET PRESENTATION DE LA THESE

1.1 INTERET FONDAMENTAL

La biosynthèse des flavonoïdes a fait l'objet de nombreuses recherches chez plusieurs espèces végétales permettant des analyses de génétique moléculaire et choisies comme modèles d'étude (par exemple le maïs - *Zea mays*, le pétunia - *Petunia hybrida*, le muflier - *Antirrhinum majus*, et plus récemment *Arabidopsis thaliana* ; Koes *et al.*, 1994 ; Lepiniec *et al.*, 2006 ; Quattrocchio *et al.*, 2006). Les principales étapes enzymatiques aboutissant à la synthèse de ces composés ont été caractérisées à ce jour, excepté pour la biosynthèse des anthocyanes et des proanthocyanidines (PA) pour lesquelles certaines étapes n'ont pas encore été élucidées (Winkel-Shirley, 2001). En plus de l'intérêt présenté par une meilleure compréhension de la biochimie de ces composés, la voie de biosynthèse des flavonoïdes constitue plus généralement un modèle pour l'étude de l'organisation du métabolisme secondaire chez les végétaux. Par exemple, les mécanismes permettant la synthèse de ces composés dans le cytoplasme puis leur transfert spécifique dans la vacuole font actuellement l'objet de nombreuses études (Mueller et Walbot, 2001 ; Winkel, 2004 ; et §3.2.5). D'autre part, la régulation spatiale et temporelle de la biosynthèse des flavonoïdes est très stricte avec une possibilité de déclenchement en réponse à des stimuli endogènes (métaboliques ou hormonaux) ou environnementaux (réponse à la lumière, au froid et aux pathogènes) caractéristiques de voies de signalisation qui restent encore à préciser (Winkel-Shirley, 2002). Les régulateurs de la production des anthocyanes chez le maïs furent parmi les premiers facteurs de transcription isolés chez les végétaux (Paz-Ares *et al.*, 1987 ; Dellaporta *et al.*, 1988) et de façon surprenante pour cette époque révélèrent une forte homologie avec des facteurs de transcription de mammifères. Leur caractérisation fonctionnelle a permis depuis de mettre en évidence un mécanisme d'interaction entre deux familles de facteurs de transcription, les facteurs MYB et les facteurs bHLH (§4.3.2). Ce mécanisme ne semble pas limité à la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes, au contraire, il pourrait être à la base de l'action de nombreuses protéines MYB et bHLH, deux familles de facteurs qui ont connu une forte extension chez les plantes (Dubos *et al.*, 2010 ; Heim *et al.*, 2003 ; Stracke *et al.*, 2001 ; Toledo-ortiz *et al.*, 2003). La régulation de la biosynthèse des flavonoïdes s'est donc imposée plus largement comme un véritable modèle d'étude de la régulation de l'expression

des gènes chez les végétaux, c'est pourquoi, elle fait l'objet de nombreuses recherches visant à mieux comprendre les mécanismes mis en jeu.

1.2 INTERET BIOTECHNOLOGIQUE

Parmi les métabolites secondaires produits par les végétaux, de nombreux composés présentent un intérêt pharmaceutique. Cependant, leur production en faible quantité rend souvent difficile leur utilisation et même leur évaluation thérapeutique. De plus, la complexité des structures chimiques ne permet pas toujours de produire ces composés par les méthodes de chimie classique. Une solution envisagée serait la modification *in planta* du niveau de production des composés d'intérêt par des méthodes biotechnologiques (Gantet et Memelink 2002 ; Grotewold, 2008 ; Schillmiller *et al.*, 2008). Dans ce but, de nombreux essais ont été réalisés, utilisant comme modèle la biosynthèse des anthocyanes en cherchant tout d'abord à modifier la couleur des fleurs de certaines espèces ornementales (Forkmann et Martens, 2001). Plusieurs essais d'augmentation de la production des flavonols, des PA ou des isoflavonoïdes ont également été réalisés (Bovy *et al.*, 2002 ; Robbins *et al.*, 2003 ; Liu *et al.*, 2002). Ces travaux ont par ailleurs permis de mettre en évidence et de mieux caractériser les mécanismes de co-suppression se produisant par exemple lors de l'expression ectopique de la chalcone-synthase (CHS) chez le pétunia et caractéristiques de réponses à certains pathogènes (Metzlaff *et al.*, 1997 ; Que *et al.*, 1997).

1.3 OBJECTIFS DE LA THESE ET PRESENTATION DU MEMOIRE

L'objet de ce manuscrit de thèse est de constituer une synthèse bibliographique de l'état des connaissances actuelles sur la biosynthèse des flavonoïdes en détaillant les différentes étapes enzymatiques mais surtout en s'attachant à décrire les avancées récentes dans la compréhension des mécanismes de régulation de ces enzymes. Tout d'abord, les composés flavonoïques, leur structure, leur fonction présumée chez les végétaux et leur importance en nutrition animale et humaine sont présentées (§2). Puis un intérêt particulier est apporté à la plante modèle *A. thaliana* pour laquelle de nombreuses données génétiques et biochimiques sont disponibles, concernant notamment la biosynthèse d'une classe particulière de flavonoïdes : les PA (§3). Ces composés sont accumulés dans les téguments de la graine d'*A. thaliana* et ont fait l'objet d'études lors d'un travail de recherche effectué dans le laboratoire de Biologie des Semences du centre INRA de Versailles (A. Baudry, Thèse de

doctorat en Sciences, 2004). Après une présentation des principales classes de protéines régulatrices des PA : MYB, bHLH et à domaine WDR (§4 et 5), des résultats concernant le mode d'action de plusieurs de ces protéines sont présentés sous la forme de trois publications scientifiques. Une première publication (Baudry *et al.*, 2004 ; §6) décrit la formation d'un complexe de facteurs de transcription entre les régulateurs TT2 (MYB), TT8 (bHLH) et TTG1 (WDR) et l'importance de ce complexe pour l'activation des enzymes de biosynthèse, notamment *BANYULS* (*BAN*). Les mécanismes de régulation de *TT8* et l'existence d'une boucle d'auto-régulation amplifiant l'expression de ce gène sont décrits dans une seconde publication (Baudry *et al.*, 2006 ; §7). Enfin, les résultats obtenus pour la caractérisation d'un régulateur négatif de la biosynthèse des flavonoïdes sont présentés dans une troisième publication (Dubos *et al.*, 2008 ; §8).

2 GENERALITES SUR LES COMPOSES FLAVONOÏQUES

2.1 LES FLAVONOÏDES CHEZ LES VEGETAUX

2.1.1 Structure des flavonoïdes

Les flavonoïdes forment une famille de composés issus du métabolisme secondaire des végétaux dont plus de 4000 membres ont été caractérisés à ce jour (Forkmann et Heller, 1999). Ce sont des composés polyphénoliques possédant un squelette carboné de type C6-C3-C6 formé de deux cycles aromatiques (A et B) et d'un hétérocycle contenant un atome d'oxygène (C). Suivant le niveau d'oxydation de l'hétérocycle central C, plusieurs familles de composés ont été définies, elles sont présentées dans la Figure 1. Le premier flavonoïde synthétisé, servant de point de départ à la synthèse des autres composés, est une flavanone (**2**) comme par exemple la naringénine ou l'eryodictyol. L'hydroxylation en position 3 permet la formation de dihydroflavonols (**3** ; dihydrokaempférol, dihydroquercétine et dihydromyricétine), dont la réduction du groupement cétone en position 4 conduit aux flavan-3,4-diols aussi appelés leucoanthocyanidines (**4** ; leucopélargonidine, leucocyanidine et leucodelphinidine) puis aux flavan-3-ols (**5** ; afzéléchine, [épi]-catéchine et [épi]-gallocatéchine). La formation d'une double liaison entre les atomes de carbone 2 et 3 des flavanones et des dihydroflavonols conduit à la formation de flavones (**6** ; apigénine et lutéoline) et de flavonols (**7** ; kaempférol, quercétine et myricétine), respectivement. Les anthocyanidines (**8** ; pélargonidine, cyanidine et delphinidine) sont les précurseurs des anthocyanes, elles présentent un système de doubles liaisons conjuguées dans leur molécule, qui est à l'origine de la couleur rouge ou bleue de ces composés. Les proanthocyanidines (PA, **9**) sont ainsi nommées car à la suite d'une hydrolyse en milieu acide elles permettent de former des anthocyanidines. Ce sont des polymères (propélargonidine, procyanidine et prodelphinidine) résultant de la condensation d'unités de flavan-3,4-diols ou de flavan-3-ols à partir d'une molécule de départ de type flavan-3-ol (le plus souvent la catéchine ou l'épicatéchine). Les isoflavones (**10** ; daidzéine et génistéine) se distinguent des autres composés par la fixation du noyau B en position 3 de l'hétérocycle (au lieu de la position 2). Les chalcones (**11** ; naringénine-chalcone) et les aurones (**12** ; hispidol) bien que ne présentant pas le squelette typique des flavonoïdes sont originaires de la même voie de biosynthèse. En plus de ces variations de la structure de l'hétérocycle, plusieurs modifications peuvent se produire pour les cycles aromatiques A et B, comme par exemple des hydroxylation, des

méthylations, des glycosylations (O- ou C-glycosylations), des acylations ou des prénylations. Ces nombreuses modifications sont à l'origine de l'extraordinaire diversité des flavonoïdes chez les végétaux.

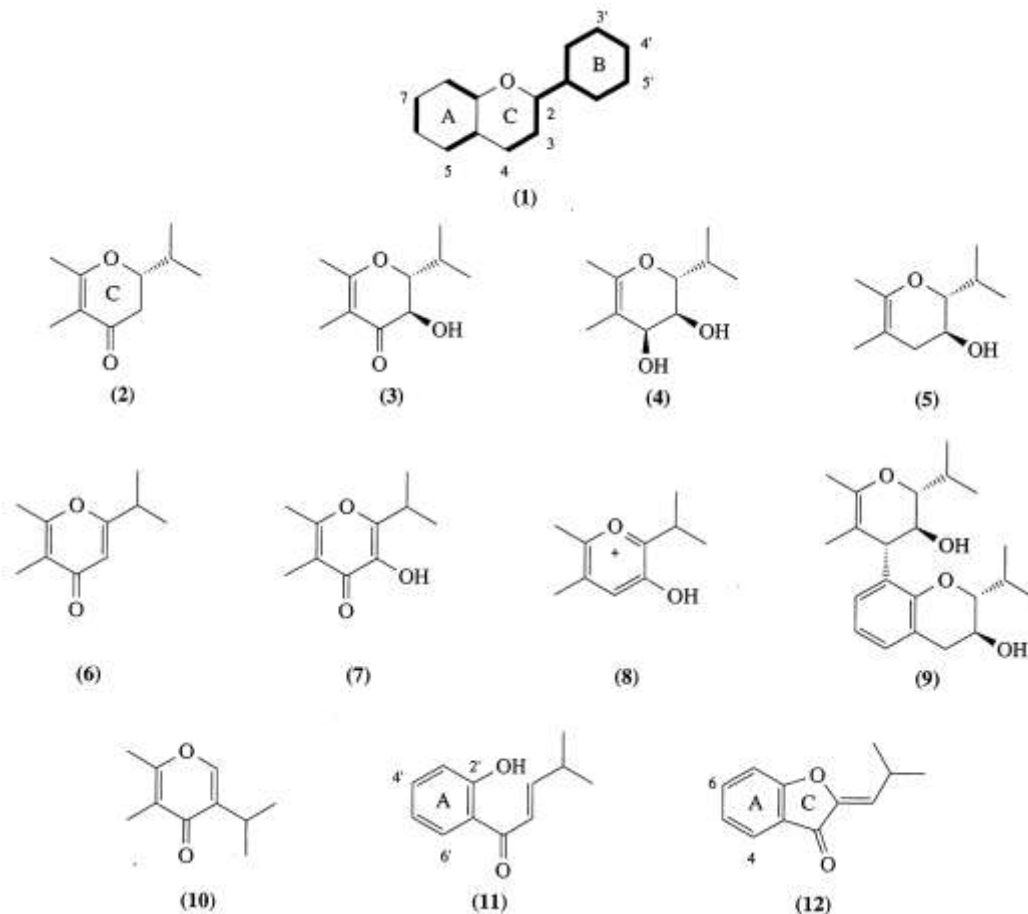


Figure 1 : Structure chimique des flavonoïdes (Forkmann et Heller, 1999)

Dans la molécule de base des flavonoïdes (1), le 4-coumaroyl-CoA et les trois unités de malonyl-CoA à l'origine de la structure caractéristique en C6-C3-C6 sont signalés par des traits gras. En fonction du niveau d'oxydation de l'hétérocycle central C, on distingue : les flavanones (2), les dihydroflavonols (3), les flavan-3,4-diols (4), les flavan-3-ols (5), les flavones (6), les flavonols (7) et les anthocyanidines (8). Les PA (9) sont des polymères du noyau flavonoïde. Les isoflavones (10) se distinguent des autres classes par une fixation du noyau B en position 3 de l'hétérocycle (au lieu de la position 2). Les chalcones (11) et les auronnes (12), bien que ne possédant pas la structure typique des flavonoïdes, ont la même origine biosynthétique.

2.1.2 Fonctions des flavonoïdes chez les végétaux

Protection contre les rayonnements UV et contre les stress oxydants

Les flavonoïdes sont des composés qui absorbent les rayonnements lumineux dans le domaine visible et dans l'UV où se situe leur maximum d'absorbance. Accumulés principalement dans les tissus épidermiques, ils peuvent jouer un rôle d'écran protecteur vis-

à-vis de ces radiations (Bohm, 1998). D'ailleurs, l'expression des gènes de biosynthèse des flavonoïdes comme celle de nombreux gènes de biosynthèse des phénylpropanoïdes suit un rythme circadien et précède le lever du jour (Harmer *et al.*, 2000) et elle peut être fortement induite à la suite d'irradiations artificielles (Ferreira *et al.*, 2010). Les principaux composés impliqués dans ce rôle protecteur sont les flavonols et d'autres polyphénols, les esters de l'acide sinapique. Les plantes qui ne produisent pas ces composés sont plus sensibles aux rayonnements UV de type B (280 à 320 nm) et aux stress oxydants qu'ils induisent, dont les effets délétères non spécifiques se traduisent par la formation de lésions foliaires et une inhibition de croissance (Li *et al.*, 1993a ; Landry *et al.*, 1995). Ce rôle antioxydant a également pour conséquence de limiter les dommages de l'ADN causés par les espèces réactives de l'oxygène (oxygène singulet). Un effet protecteur a pu être montré à la fois *in vitro* et *in vivo* (Kootstra, 1994 ; Filkowski *et al.*, 2004).

Attraction des pollinisateurs et dispersion des graines

Les flavonoïdes sont les principaux pigments et co-pigments rencontrés chez les végétaux (Grotewold, 2006). Chez certaines espèces, l'accumulation des anthocyanes et des flavonols dans les pétales constitue un signal visuel pour l'attraction des insectes pollinisateurs, en complément de l'attraction chimique (Bohm, 1998). En accord avec cette fonction, l'activité transcriptionnelle des gènes codant pour les enzymes de production des anthocyanes est maximale dans l'épiderme des pétales, juste avant l'ouverture de la fleur de pétunia (*Petunia hybrida* ; Koes *et al.*, 1994). L'accumulation des flavonoïdes dans les fruits joue aussi un rôle dans l'attraction des animaux dispersant les graines.

Germination du grain de pollen et croissance du tube pollinique

Les flavonoïdes s'accumulent dans les anthères et le pistil de nombreuses espèces végétales. Leur importance a tout d'abord été mise en évidence par l'isolement de mutants stériles de maïs (*Zea mays*) et de pétunia affectés dans la production de flavonoïdes (mutants de CHS ; Taylor et Jorgensen, 1992). Les composés impliqués sont le kaempférol et d'autres flavonols glycosylés (diglucosides spécifiques du grain de pollen), leur présence dans les stigmates stimule la germination du grain de pollen et la croissance du tube pollinique (Mo *et al.*, 1992 ; Vogt et Taylor, 1995). Cette propriété a été utilisée pour la génération de mutants mâles stériles par inactivation de la synthèse de ces composés dans le grain de pollen

(utilisation pour la production d'hybrides ; Forkmann et Martens, 2001). Cependant, chez certaines plantes comme *A. thaliana*, le muflier (*Antirrhinum majus*) ou le persil (*Petroselinum crispum*), la fertilité des mutants de biosynthèse des flavonoïdes n'est pas affectée, ce qui indique que ce rôle des flavonoïdes n'est pas universel (Burbulis *et al.*, 1996 ; Bohm, 1998).

Messagers secondaires dans l'interaction plante-microorganismes

Les flavonoïdes jouent un rôle particulier dans les interactions symbiotiques entre les plantes de la famille des Légumineuses et les bactéries des genres *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* et *Azorhizobium* (Lima *et al.*, 2009 ; Magori et Kawaguchi, 2009 ; Peters *et al.*, 1986 ; Redmond *et al.*, 1986). Les flavones exsudées par les racines des Légumineuses sont importantes pour les premières étapes de l'interaction entre la plante et la bactérie. Elles ont un effet chémo-attracteur de la bactérie présente dans le sol, chez qui elles déclenchent l'expression des gènes de nodulation (gènes Nod). La structure chimique des flavones exsudées est variable suivant les espèces de Légumineuses. Cette diversité participe à l'établissement d'une véritable spécificité entre la plante hôte et la bactérie, de façon complémentaire avec la variabilité de la structure des lipochitoooligosaccharides (facteurs Nod) émis par la bactérie (Schultze et Kondorosi, 1998).

Défense contre les pathogènes

Les flavonoïdes appartiennent à la classe des phytoalexines, c'est-à-dire aux molécules qui sont synthétisées par les plantes après une exposition à des pathogènes (Field *et al.*, 2006). Les isoflavonoïdes des Légumineuses (maackiain et mucronulatol), les flavans et les flavanones ont une activité antifongique (Harborne et Williams, 2000). Par exemple, de fortes concentrations de maackiain dans les feuilles de certaines Légumineuses ont été corrélées à une résistance aux infections par *Botrytis cinerea*.

Régulation du transport des auxines

Plusieurs travaux suggèrent que les flavonoïdes ont un rôle dans la régulation endogène du transport des auxines (Peer et Murphy, 2007). Tout d'abord, il a été montré un effet inhibiteur *in vitro* des transporteurs d'efflux d'auxine par la quercétine et le kaempférol

(Jacobs et Rubery, 1988). Lors de cultures d'*A. thaliana* sur des milieux contenant un précurseur de ces composés (naringénine), un effet inhibiteur de la croissance et du gravitropisme des racines a été observé, ce qui est caractéristique des inhibiteurs du transport de l'auxine (Brown *et al.*, 2001). Le mutant *tt4* d'*A. thaliana* (mutant de CHS) présente des inflorescences moins développées que le type sauvage mais avec un nombre plus important de tiges et de racines secondaires, en accord avec une possible perturbation de la distribution des auxines (Brown *et al.*, 2001). Cet effet inhibiteur des transporteurs d'efflux d'auxine aurait pour conséquence de moduler la concentration locale en auxine. Par exemple, les flavonols accumulés à la jonction entre l'hypocotyle et la racine, pourraient permettre de limiter l'induction des racines secondaires par l'auxine produite dans les parties végétatives (Murphy *et al.*, 2000). Dans la pointe racinaire, la modulation du taux de flavonoïdes en réponse aux conditions environnementales aurait un effet direct sur le transport de l'auxine et son contrôle du développement de la racine en réponse à la gravité et à la lumière (Buer et Muday, 2004).

Rôle des flavonoïdes de la graine

Les flavonoïdes sont présents dans les graines de tous les végétaux. En plus des rôles déjà décrits dans la dispersion des graines, la protection contre les stress oxydants ou contre les pathogènes, des propriétés supplémentaires sont liées à l'accumulation des PA (Rajjou et Debeaujon, 2008 ; Winkel-Shirley, 1998). Ces polymères de flavonoïdes sont présents dans les graines de sorgho (*Sorghum bicolor*), d'orge (*Hordeum vulgare*) et de la plupart des Dicotylédones. Par leurs propriétés mécaniques, les PA interviennent dans le renforcement de la structure des téguments. En conséquence, leur présence va augmenter la dormance mais aussi la longévité des graines (Debeaujon *et al.*, 2000).

2.2 IMPORTANCE DES FLAVONOÏDES EN NUTRITION HUMAINE ET ANIMALE

2.2.1 Intérêt des flavonoïdes en alimentation humaine

Introduction

Les flavonoïdes sont présents en quantité importante dans de nombreux aliments d'origine végétale, comme les fruits, le thé, le café, le cacao et le vin. Plusieurs études ont révélé leurs effets bénéfiques, en montrant notamment une corrélation entre une alimentation

riche en flavonoïdes et une réduction des risques de survenue de plusieurs maladies chroniques comme les accidents vasculaires ou certains cancers (Knekt *et al.*, 2002 ; Ross et Kasum, 2002). Ces effets sont liés au pouvoir antioxydant de ces composés, à l'inhibition spécifique de nombreuses enzymes et à un effet protecteur vasculaire. De plus, d'autres propriétés intéressantes peuvent être attribuées à certains flavonoïdes ayant une structure chimique particulière.

Malgré ces nombreux effets bénéfiques, il n'est cependant pas recommandé de supplémentation systématique par les flavonoïdes car une alimentation variée, équilibrée et avec un apport calorique suffisant réussit à couvrir les besoins naturels d'un Homme sain (recommandations de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments - AFSSA - 2007). De plus, les flavonoïdes se prêtent mal à une supplémentation car lorsqu'ils sont administrés sous forme synthétique ou bien après purification, leur absorption reste faible en raison d'une biodisponibilité réduite, par exemple elle serait inférieure à 25% dans le cas de l'hésperidine (Ameer *et al.*, 1996). Cette absorption serait par contre facilitée pour les flavonoïdes présents naturellement dans les aliments grâce à la présence d'autres composés et peut varier de façon importante suivant la source. Par exemple pour la quercétine, il a été observé une absorption plus efficace à partir d'oignon que de thé (Ross et Kassum, 2002). Plus récemment, une biodisponibilité de 80% a été décrite pour les flavonoïdes présents dans la propolis (Gardana *et al.*, 2007).

Par contre, les flavonoïdes de pamplemousse, parmi d'autres composés, ont des propriétés inhibitrices du cytochrome CYP3A4, une enzyme intervenant dans le métabolisme des xénobiotiques et donc pouvant affecter la biodisponibilité de nombreux médicaments (Uno et Yasui-Furukori, 2006). Cet effet justifie de déconseiller la consommation de pamplemousse lors de certains traitements (médicaments immunosuppresseurs comme le tacrolimus et la ciclosporine ou hypocholestérolémiantes - atorvastatine et simvastatine).

D'autre part, il existe peu de données pharmacologiques concernant les PA, car ces composés sont difficiles à extraire et à caractériser chimiquement et ils ont été souvent oubliés des études systématiques visant à évaluer l'activité des flavonoïdes (Bohm, 1998 ; Santos-Buelga et Scalbert, 2000). Cependant, une nouvelle approche consistant à introduire des graines de mutants d'*A. thaliana* dans le régime alimentaire de rats de laboratoire a été récemment mise en place (Luceri *et al.*, 2008). Afin de comparer les effets des différentes classes de flavonoïdes, plusieurs mutants affectés dans la biosynthèse de certains composés ont été sélectionnés ainsi que le type sauvage comme référence. Bien que cette étude ait

permis de confirmer un effet bénéfique lié aux flavonols et aux anthocyanes, elle n'a pas permis de mettre en évidence un effet spécifique lié aux PA.

Rôle antioxydant

De par leur effet réducteur, les flavonoïdes participent à l'inactivation des espèces oxydantes (radicaux libres, anion superoxyde et oxygène singulet). L'efficacité de cette inactivation est liée principalement à la présence d'un groupement catéchol sur le cycle B (c'est le cas par exemple pour la catéchine, la lutéoline et la quercétine), à la double liaison entre le C2 et le C3, et au groupement carbonyle présent en C4 (Harborne et Williams, 2000). Il a été également mis en évidence une augmentation de cet effet antioxydant lors de l'association des flavonoïdes sous forme de polymères (PA ; Ross et Kasum, 2002). L'effet antioxydant déterminé *in vitro* serait supérieur à celui des vitamines C et E (Rice-Evans, 1997).

Activité anti-inflammatoire

Plusieurs activités des flavonoïdes sont expliquées par leur propriété de liaison aux protéines qui se traduit par une inhibition de certaines enzymes (Bohm, 1998). Par exemple, ils sont capables d'inhiber plusieurs enzymes intervenant dans la genèse de la réaction inflammatoire : la cyclo-oxygénase, la 5-lipoxygénase et la prostaglandine endoperoxyde hydrogen synthase (PGHS). En ce qui concerne cette dernière enzyme, la cyanidine semble avoir un effet inhibiteur spécifique de l'isoforme PGHS-2, ce qui permet un effet anti-inflammatoire en évitant les effets indésirables liés à une inhibition concomitante de l'activité de PGHS-1, comme par exemple la formation d'ulcères gastriques (Harborne et Williams, 2000).

Effet protecteur vasculaire

L'effet protecteur vasculaire, aussi appelé propriété vitaminique P, est la conséquence de l'activité des flavonoïdes sur plusieurs composants du sang et des vaisseaux (Harborne et Williams, 2000 ; Santos-Buelga et Scalbert, 2000). Cet effet permet d'expliquer les corrélations observées entre une alimentation riche en flavonoïdes et une réduction du risque de survenue d'accidents vasculaires (Ross et Kasum, 2002). En raison de leur rôle antioxydant, les flavonoïdes ont un effet inhibiteur de la peroxydation des lipides du sang (LDL), processus qui intervient précocement dans l'athérosclérose. Une action inhibitrice a aussi été mise en évidence sur les plaquettes qui participent à la formation de la plaque

d'athérome. Cette activité serait liée à l'inhibition de la phosphodiesterase de l'AMPc plaquettaire, entraînant une réduction de la capacité d'agrégation des plaquettes et de leur production de médiateurs pro-inflammatoires (thromboxane A2). En plus de cette action anti-athéromateuse, les flavonoïdes auraient également un rôle protecteur des capillaires sanguins en renforçant leur résistance, par action sur les cellules endothéliales (inhibition de l'activité de l'adénosine désaminase).

Cet effet protecteur vasculaire des flavonoïdes est un des facteurs avancés pour justifier le « French Paradox ». En effet, des études épidémiologiques réalisées dans le sud de la France ont révélé une mortalité faible liée aux maladies cardiovasculaires, malgré plusieurs facteurs de risque importants comme le tabagisme ou une alimentation riche en graisses (Lekli *et al.*, 2010 ; Lippi *et al.*, 2010 ; Renaud et De Lorgeril, 1992 ; Vidavalur *et al.*, 2010). Ce paradoxe pourrait s'expliquer en partie par la consommation modérée de vin rouge qui contient une grande quantité de polyphénols. Le principal flavonoïde est la catéchine avec une concentration moyenne de 190 mg/l (Harborne et Williams, 2000). Les autres polyphénols présents sont l'acide gallique (95 mg/l), l'épicatéchine (82 mg/l), la malvidine 3-glucoside (24 mg/l), la rutine (9 mg/l), la myricétine (8 mg/l), la quercétine (8 mg/l), l'acide cafféique (7 mg/l), la cyanidine (3 mg/l) et le resvératrol (1.5 mg/l).

Propriétés antibactériennes et antivirales

Du fait de leur activité anti-microbienne chez les plantes, de nombreuses études ont recherché à mettre en évidence des effets antibactériens ou antiviraux des flavonoïdes, dans le but d'une utilisation de ces molécules en médecine. Plusieurs composés ont été isolés, dont certains sont efficaces *in vitro* contre *Staphylococcus aureus* (isoflavones de soja ; Harborne et Williams, 2000 ; Wang *et al.*, 2010). D'autres composés comme la baicalin (5,6,7-trihydroxy-flavone 7-glucuronide) isolée de *Scutellaria baicalensis* semblent avoir une activité inhibitrice de la réplication du virus du SIDA en interférant *in vitro* avec son mode d'infestation des cellules CD4 (Li *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 1993b).

Propriétés des phyto-oestrogènes

Certaines propriétés des flavonoïdes sont propres à une classe particulière de composés : les isoflavonoïdes des Légumineuses (Dixon, 2004). Ces molécules, par exemple la génistéine et la daidzéine, peuvent se lier aux récepteurs aux oestrogènes des mammifères et de ce fait avoir une activité oestrogénique ou antioestrogénique. Dans ce dernier cas, il se produit alors une compétition avec l'estradiol endogène. Bien que les mécanismes mis en jeu

ne soient pas encore bien compris, un risque plus faible de survenue de certains cancers (cancer du sein et cancer de la prostate) a pu être associé au régime riche en soja et donc en isoflavonoïdes des populations asiatiques. D'autre part, les isoflavonoïdes sont utilisés sous forme de compléments alimentaires pour prévenir la survenue des troubles liés au déficit d'oestrogènes après la ménopause : ostéoporose et bouffées de chaleur. Cependant, l'AFSSA (2005) recommande de limiter leur consommation quotidienne chez l'adulte à 1 mg/kg en raison d'effets indésirables décrits lors de plusieurs études menées sur modèles animaux. De plus, leur consommation est déconseillée aux femmes ayant des antécédents personnels ou familiaux de cancer du sein, aux femmes enceintes et aux enfants de moins de 3 ans (dans ce dernier cas, afin de prévenir la survenue de problèmes de maturation des organes sexuels ou de fertilité).

2.2.2 Intérêt spécifique des PA en alimentation animale

Des effets bénéfiques, spécifiques des PA, ont été mis en évidence lors de l'addition de certaines Légumineuses au fourrage des herbivores (Aerts *et al.*, 1999). Ces plantes qui accumulent des PA dans leurs feuilles et leurs bourgeons sont le sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) et le lotier (*Lotus corniculatus* et *L. pedunculatus*). Les fourrages qui en contiennent à hauteur de 2 à 4 % du poids sec en PA, permettent une amélioration du métabolisme digestif des protéines. Cet effet est attribué à la formation de complexes réversibles entre les PA et les protéines lors de leur passage dans le rumen, évitant ainsi leur fermentation rapide par les micro-organismes qui y sont présents. La digestion des protéines se produit alors dans l'intestin et l'absorption des acides aminés (aa) essentiels est alors favorisée. En conséquence, de meilleurs rendements en laine (amélioration de 11 %) ou en lait (amélioration de 21 %) ont été observés. Un autre effet bénéfique des PA est lié à leurs propriétés antiparasitaires sur les parasites intestinaux (helminthes). Par contre, pour des concentrations trop élevées (6 à 12 % du poids sec), les PA ont un effet anti-digestif en empêchant l'absorption des aliments par l'intestin. Afin de pouvoir disposer de plantes présentant à la fois les effets bénéfiques des PA et une haute valeur nutritive, des essais d'hybridation somatiques entre le sainfoin et la luzerne (*Medicago sativa*) ont été réalisés. Mais l'échec de ces premières approches a favorisé la mise en œuvre de méthodes biotechnologiques dans plusieurs pays, dans le but d'augmenter la production des PA dans les feuilles de luzerne (Aerts *et al.*, 1999).

Au contraire, la présence de PA et d'autres polyphénols dans les graines de colza (*Brassica napus*) représente un obstacle à l'utilisation des tourteaux de colza en alimentation

animale (Auger, 2010 ; Naczk *et al.*, 1998 ; Marles et Gruber, 2004). Ces résidus de l'extraction des huiles sont composés à 40 % de protéines et possèdent une haute valeur nutritive. Mais la présence de quantités importantes de PA, en plus de conférer une amertume et une astringence aux tourteaux, diminue la biodisponibilité des protéines par formation de complexes. L'amélioration de certains caractères génétiques de la graine de colza par des procédés biotechnologiques pourrait permettre une meilleure valorisation des tourteaux de colza et de nombreuses recherches sont effectuées dans ce but (N. Nesi, INRA de Rennes ; L. Lepiniec, INRA de Versailles ; les travaux présentés dans ce mémoire de thèse).

3 LA BIOSYNTHESE DES PA CHEZ ARABIDOPSIS THALIANA

3.1 METHODE D'ETUDE

Les principales méthodes mises en œuvre pour la caractérisation des étapes impliquées dans la biosynthèse des PA sont des méthodes génétiques. En effet, les méthodes biochimiques d'isolement d'enzymes à partir de tissus accumulant les PA sont difficiles à réaliser, du fait de l'agrégation non spécifique de ces composés avec les protéines. Plusieurs approches de génétique ont donc été développées chez *A. thaliana*, aboutissant à la constitution de collections de mutants de biosynthèse des PA (Abrahams *et al.*, 2002 ; Lepiniec *et al.*, 2006 ; Nesi, 2001 ; Wisman *et al.*, 1998 ; Tableau 1). Pour cette approche, *A. thaliana* présente l'avantage d'une organisation relativement simple de la voie de biosynthèse des flavonoïdes, puisque la plupart des gènes codant pour les enzymes impliquées sont présents en copie unique dans le génome, à l'exception de la flavonol synthase (FLS ; Winkel-Shirley, 2001).

Chez *A. thaliana*, les PA sont accumulées uniquement dans les téguments de la graine à laquelle elles confèrent une coloration brune. Lors d'une perturbation de la production de ces composés, les graines produites ont une couleur jaune qui est due aux caroténoïdes de l'embryon (Koorneef, 1990), les téguments étant devenus « transparents ». D'où l'appellation de mutant *transparent testa (tt)* attribuée aux mutants de biosynthèse des PA. Selon l'élément touché par la mutation, la production des autres flavonoïdes (anthocyanes et flavonols) peut aussi être affectée. Chez les deux mutants *ttg1* et *ttg2*, pour *transparent testa glabra*, le phénotype *tt* est associé à une perturbation de la production des trichomes et des mucilages dans les graines (Koorneef, 1981). Un autre mutant criblé sur la base du phénotype de la couleur de la graine est le mutant *banyuls (ban)*. A cause de l'accumulation d'un composé intermédiaire coloré, probablement de la cyanidine, les graines de ce mutant sont de couleur violette, puis grise après maturation (Albert *et al.*, 1997).

Dans le but d'identifier d'autres mutants affectés dans la production des PA, un crible a été effectué par coloration de la graine avec du p-diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACA), un réactif spécifique des PA et de leurs précurseurs directs (flavan-3,4-diols et flavan-3-ols). Des mutants correspondant à six groupes de complémentation ont été isolés : *tds1-6* pour *tanin deficient seed* (Abrahams *et al.*, 2002). La mutation *ban* étant épistatique sur la plupart des mutations *tds* (*tds1*, 2, 3, 5, 6), il a été proposé que les mutants *tds* soient affectés dans des étapes spécifiques de la production des PA telles que le transport ou la

condensation des monomères (Abrahams *et al.*, 2003). Cependant, la possibilité que certains mutants *tds* soient alléliques aux mutants *tt* non encore caractérisés au niveau moléculaire (*tt9*, *11*, *13-15*, *17*) n'a pas été envisagée et la question reste entière quant à savoir si les nouveaux mutants isolés par ce criblage correspondent ou pas à de nouveaux loci.

Mutant	Phénotype	Locus	Protéine	Référence
<i>ban</i>	graine grise	At1g61720	ANR	Devic <i>et al.</i> , 1999
<i>tds1-3</i> , <i>5</i> , <i>6</i>	production d'épicatéchine, pas de PA, brunissement graine après la récolte	-	-	Abrahams <i>et al.</i> , 2002
<i>tt1</i>	graine jaune	At1g34790	Zn finger	Sagasser <i>et al.</i> , 2002
<i>tt2</i>	graine jaune	At5g35550	R2R3-MYB	Nesi <i>et al.</i> , 2001
<i>tt3</i>	graine jaune	At5g42800	DFR	Shirley <i>et al.</i> , 1992
<i>tt4</i>	graine jaune	At5g13930	CHS	Feinbaum et Ausubel, 1988
<i>tt5</i>	graine jaune	At3g55120	CHI	Shirley <i>et al.</i> , 1992
<i>tt6</i>	graine marron pâle	At3g51240	F3H	Wisman <i>et al.</i> , 1998
<i>tt7</i>	graine marron pâle	At5g07990	F3'H	Schoenbohm <i>et al.</i> , 2000
<i>tt8</i>	graine jaune	At4g09820	bHLH	Nesi <i>et al.</i> , 2000
<i>tt9</i>	graine grise	-	-	Shirley <i>et al.</i> , 1995
<i>tt10</i>	graine jaune lors de la récolte, brunissement progressif	-	-	Pourcel <i>et al.</i> , 2005
<i>tt11</i>	graine jaune	-	-	Nesi, 2001
<i>tt12</i>	graine marron pâle	At3g59030	transporteur	Debeaujon <i>et al.</i> , 2001
<i>tt13</i>	graine marron pâle	-	-	Nesi, 2001
<i>tt14</i>	graine jaune lors de la récolte, brunissement progressif	-	-	Nesi, 2001
<i>tt15</i>	graine grise	-	transférase	Nesi, 2001
<i>tt16</i>	graine jaune	At5g23260	MADS box	Nesi <i>et al.</i> , 2002
<i>tt17</i>	graine jaune	-	-	Bharti et Khurana, 2003
<i>tt18=tds4</i>	graine jaune	At4g22880	LDOX	Shikazono <i>et al.</i> , 2003
<i>tt19</i>	graine jaune lors de la récolte, brunissement progressif	At5g17220	AtGSTF12	Wagner <i>et al.</i> , 2002 Kitamura <i>et al.</i> , 2004
<i>ttg1</i>	graine jaune sans mucilages, absence trichomes et anthocyanes, poils racinaires surnuméraires	At5g24520	WDR	Walker <i>et al.</i> , 1999
<i>ttg2</i>	graine jaune foncée sans mucilages, trichomes en nombre réduit et à morphologie affectée	At2g37260	WRKY	Johnson <i>et al.</i> , 2002

Tableau 1: Mutants de biosynthèse des PA chez *A. thaliana*

ban, *banyuls* ; *tds*, *tanin-deficient seed* ; *tt*, *transparent testa* ; *ttg*, *transparent testa glabra*.

3.2 BIOCHIMIE DE LA SYNTHÈSE DES PA

3.2.1 Généralités

Les PA sont des polymères du noyau flavonoïde (Figure 1 et 2). Leur biosynthèse débute par des étapes enzymatiques qui sont communes à plusieurs voies de biosynthèse et qui sont bien caractérisées chez plusieurs espèces végétales (Holton et Cornish, 1995). Il s'agit de la chalcone synthase (CHS), la chalcone isomérase (CHI), la flavanone 3-

hydroxylase (F3H), la flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H), la dihydroflavonolréductase (DFR) et la leucoanthocyanidine dioxygénase (LDOX). Seulement quelques étapes spécifiques de la production des PA sont connues. Il s'agit des étapes enzymatiques catalysées par BAN (également appelée anthocyanidine réductase ou ANR) et la leucoanthocyanidine réductase (ou LAR, identifiée à partir de Légumineuses mais absente chez *A. thaliana* ; Tanner *et al.*, 2003), qui permettent la formation des unités de base du polymère (épicatéchine et catéchine), et d'éléments impliqués dans le transport de ces composés vers la vacuole : un transporteur transmembranaire (TT12) et une glutathion S-transférase (TT19).

Peu de données sont disponibles sur l'étape finale de polymérisation et plusieurs questions se posent sur la structure exacte des composés utilisés. L'étude de la structure chimique des PA chez plusieurs espèces végétales a permis d'avancer un mécanisme selon lequel un composé initiateur de type catéchine servirait de point de départ à la fixation de molécules d'épicatéchine par formation de liaisons covalentes entre le C4 et le C8 (Stafford *et al.*, 1990). Cependant, la présence de catéchine ou de l'enzyme permettant sa production (LAR) n'a pas pu être mise en évidence chez *A. thaliana* suggérant que les PA de cette plante présentent une structure particulière (Tanner *et al.*, 2003). L'analyse en HPLC des résidus de l'hydrolyse acide des PA de la graine d'*A. thaliana* réalisée en présence de phloroglucinol a permis de confirmer cette hypothèse. Par cette méthode, la séparation des unités de départ du polymère des unités composant la chaîne d'élongation, a montré que ce sont uniquement des résidus d'épicatéchine qui entrent dans la composition de ces deux éléments chez *A. thaliana* (Abrahams *et al.*, 2003).

Le degré de polymérisation moyen (Dp) des PA de la graine d'*A. thaliana* serait égal à 8, ce qui est légèrement supérieur à celui des PA de feuilles de *Lotus corniculatus* et des fleurs de *Trifolium repens* avec un Dp de 6-7, et des graines de *Medicago sativa* avec un Dp de 5 (Abrahams *et al.*, 2003). Des Dp plus importants ont été mis en évidence pour les PA de grains de raisin avec 15.7 et 12.1 pour les cépages de Chardonnay et de Shiraz, respectivement. Cependant, le Dp est peut-être sous-évalué pour les PA des téguments, car ayant subi plusieurs étapes d'oxydation lors de la maturation de la graine, ces composés deviennent difficiles à extraire et à hydrolyser dans leur totalité.

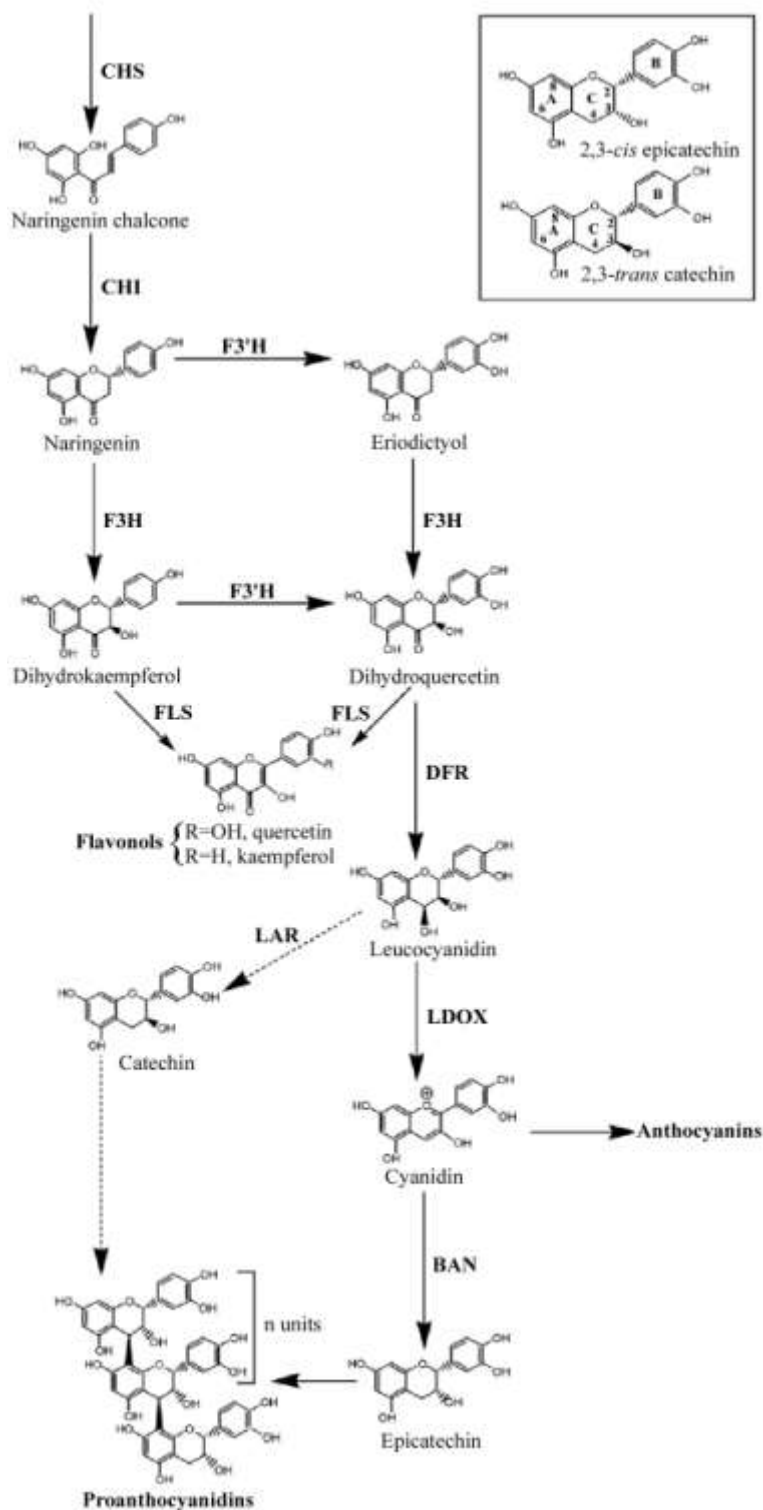


Figure 2 : Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes chez *A. thaliana* (Abrahams *et al.*, 2003)

La biosynthèse des flavonoïdes est décrite à partir de l'étape de la CHS. L'unité de départ du polymère (épicatechine) est produite par BAN qui code pour une anthocyanidine réductase. Contrairement à d'autres espèces végétales, aucun gène correspondant à une LAR putative n'a été mis en évidence dans le génome d'*A. thaliana*. D'ailleurs cette plante ne semble pas capable de produire de catéchine, c'est pourquoi cette étape est indiquée en pointillés. La différence entre les isomères 2,3-*cis* et 2,3-*trans* est expliquée dans l'encadré avec l'exemple de la catéchine et de l'épicatechine.

CHI, chalcone isomerase ; F3H, flavanone 3 β -hydroxylase ; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase ; FLS, flavonol synthase ; DFR, dihydroflavonol 4-reductase ; LAR, leucoanthocyanidine réductase ; LDOX, leucoanthocyanidine dioxygénase ; BAN, banyuls.

3.2.2 Caractéristiques des enzymes communes à plusieurs voies de biosynthèse des flavonoïdes

Chalcone synthase (CHS)

La CHS catalyse la condensation de trois groupements acétate provenant de trois molécules de malonyl-CoA avec une molécule de 4-coumaroyl-CoA pour former la naringénine chalcone qui est le point de départ de la biosynthèse de tous les composés flavonoïques. La CHS ne nécessite pas de cofacteur (Forkmann et Heller, 1999).

Le premier gène de biosynthèse des flavonoïdes à avoir été isolé est celui codant pour la CHS de persil (Holton et Cornish, 1995). Chez le pétunia, une douzaine de gènes codant pour la CHS ont été identifiés, mais une expression a pu être mise en évidence pour seulement quatre d'entre eux (*chsA*, *chsB*, *chsG* et *chsJ*). Chez le maïs, deux gènes codent pour la CHS, *c2* qui est impliqué dans la synthèse des flavonoïdes du grain de maïs et *whp* qui contrôle l'activité CHS dans le pollen. Par contre un seul gène codant pour la CHS est présent chez *A. thaliana* (At5g35550 ; Burbulis *et al.*, 1996).

Chalcone isomérase (CHI)

La CHI catalyse la cyclisation stéréospécifique des chalcones en (2S)-flavanones. Cette réaction peut également se produire spontanément *in vivo* ce qui peut conduire à la formation de quantités faibles de flavonoïdes même quand l'activité CHI est absente (Forkmann et Heller, 1999).

Flavanone 3-hydroxylase (F3H)

L'hydroxylation des flavanones en position 3 est effectuée par la F3H et conduit à la formation de dihydroflavonols. Cette réaction nécessite la présence de cofacteurs, le 2-oxoglutarate et les ions ferreux (Forkmann et Heller, 1999). Les gènes codant pour la F3H ont été clonés dans de nombreuses espèces de plantes y compris le mufler, le pétunia, le maïs et *A. thaliana* (Pelletier et Shirley, 1996). La comparaison de ces différents clones a révélé une grande conservation de la séquence en aa (entre 68 et 95 % d'homologie) avec un domaine caractéristique de 14 aa comprenant 3 H probablement impliquées dans la liaison des ions ferreux (Forkmann et Heller, 1999).

Flavonoïde 3'-hydroxylase (F3'H)

La F3'H catalyse l'hydroxylation en 3' du noyau aromatique B. Elle appartient à la famille des enzymes à cytochrome P450 et a besoin de NADPH pour cofacteur (Forkmann et Heller, 1999). Chez *A. thaliana*, la F3'H est codée par le gène *TT7* (At5g07990). Les plantes *tt7* accumulent les flavonoïdes hydroxylés en 4', c'est-à-dire la pélargonidine et le kaempférol, au lieu des composés hydroxylés en 3' et en 4', cyanidine et quercétine, qui sont principalement présents chez le type sauvage (Schoenbohm *et al.*, 2000).

Dihydroflavonol 4-reductase (DFR)

La DFR catalyse la conversion des dihydroflavonols en flavan-3,4-diols. Cette réaction est stéréospécifique (formation de 2R, 3S, 4S-flavan-2,3-trans-3,4-cis-diols) et elle nécessite du NADPH comme cofacteur (Forkmann et Heller, 1999). Il a été mis en évidence une variation de l'affinité de la DFR pour ses différents substrats suivant les espèces dont elle a été isolée. Ainsi la DFR de pétunia présente une affinité forte pour la dihydromyricétine (conversion en leucodelphinidine), une affinité faible pour la dihydroquercétine mais elle ne peut pas convertir le dihydrokaempférol en leucopélargonidine. Cette spécificité particulière permet d'expliquer pourquoi parmi les anthocyanes accumulées chez le pétunia, la delphinidine occupe une place majoritaire alors que la pélargonidine n'est pas présente (Forkmann et Ruhnau, 1987). Au contraire, chez le maïs et chez le muflier, c'est la delphinidine qui n'est pas accumulée. L'expression de la DFR de maïs dans des plants de pétunia provoque alors la production de pélargonidine et confère une couleur caractéristique rouge/orange aux fleurs, couleur qui n'existe pas naturellement pour des fleurs de pétunia (Meyer *et al.*, 1987).

Leucoanthocyanidine dioxygénase (LDOX) = Anthocyanidine synthase (ANS)

L'étape enzymatique permettant la conversion des leucoanthocyanidines (ou flavan-3,4-diols) en anthocyanidines n'est pas très bien caractérisée. Elle impliquerait une réaction d'oxydation puis de déshydratation (Forkmann et Heller, 1999). La LDOX a été clonée chez plusieurs espèces, y compris chez *A. thaliana*, et l'analyse de sa séquence suggère qu'elle appartient à la famille des dioxygénases végétales utilisant le 2-oxoglutarate comme cofacteur (Abrahams *et al.*, 2003). Cependant, aucune démonstration de l'activité LDOX dans des

extraits végétaux ou après expression de la protéine recombinante chez *E. coli* n'a été réussie pour le moment. L'isolement de plusieurs mutants d'*A. thaliana* (mutants *tds4* et *tt18* ; Tableau 1) affectés dans cette étape enzymatique a permis de préciser la place de la LDOX dans la séquence de réactions conduisant aux PA. En effet, ces mutants ne produisent pas d'anthocyanes ni de PA, indiquant que la LDOX participe à la synthèse de ces deux types de composés. D'autre part, la réalisation de croisements avec *ban* a permis d'obtenir le double mutant *tds4* x *ban* présentant un phénotype identique à celui de *tds4* et démontrant que le gène *LDOX* est épistatique sur *BAN* (Abrahams *et al.*, 2003).

3.2.3 Caractéristiques des enzymes spécifiques de la biosynthèse des PA

Anthocyanidine réductase (ANR)= BANYULS (BAN)

BAN catalyse la réduction stéréospécifique des anthocyanidines en 2,3-cis-flavan-3-ols, qui formeraient les unités de base du polymère de PA (Xie *et al.*, 2003). Le clonage de *BAN* a été effectué chez *A. thaliana* à partir du mutant *ban*, issu de la banque de mutants d'ADN-T de Versailles (Devic *et al.*, 1999), puis un homologue a été identifié chez la luzerne (*Medicago truncatula* ; Xie *et al.*, 2003). A la place des PA, *ban* accumulerait des cyanidines à l'origine de la couleur violette de la graine lors du développement de la silique puis de la coloration grise après dessiccation. Ce phénotype caractéristique indique que BAN est impliqué dans la première réaction enzymatique véritablement spécifique des PA, à un embranchement avec la biosynthèse des anthocyanes (Devic *et al.*, 1999). D'ailleurs, lorsque *BAN* est exprimé de façon ectopique chez le tabac, une compétition avec la biosynthèse des anthocyanes se produit, et ces composés sont alors remplacés dans les fleurs par des flavan-3-ols, incolores (Xie *et al.*, 2003). La réaction enzymatique catalysée par BAN a pu être reproduite *in vitro* à partir d'enzyme recombinante (Xie *et al.*, 2003 ; Xie *et al.*, 2004), elle nécessite du NADPH comme cofacteur. Lors de l'utilisation de la cyanidine comme substrat, le produit formé majoritairement est l'épicatéchine, mais il se forme également une faible quantité de catéchine (Xie *et al.*, 2004). Ce produit minoritaire ne semble pas résulter d'une réaction enzymatique, mais plutôt d'une épimérisation chimique à partir de l'épicatéchine. L'importance possible de cette épimérisation spontanée dans la production des PA *in planta* reste à démontrer.

Leucoanthocyanidine réductase (LAR)

La LAR catalyse la réduction de l'hydroxyle en position 4 des leucoanthocyanidines et permet par exemple la formation de catéchine à partir de leucocyanidine. Cette activité enzymatique a été mise en évidence dans les extraits végétaux de nombreuses espèces accumulant des PA comme dans des extraits de grain d'orge ou de feuilles de Légumineuses (Forkmann et Heller, 1999). Le clonage de cette enzyme est relativement récent (Tanner *et al.*, 2003). Elle a été purifiée à partir des feuilles de la Légumineuse *Desmodium uncinatum* qui accumulent des quantités importantes de PA. La séquence de la LAR de *D. uncinatum* montre une homologie avec les enzymes de type isoflavone réductase ce qui permet de la classer dans les enzymes à fonction réductase, épimérase et déshydrogénase (classe RED). Aucun orthologue putatif de cette enzyme n'a pu être décelé dans le génome d'*A. thaliana*, d'autant plus qu'aucune activité LAR n'a pu être détectée dans des extraits de siliques en développement. En accord avec ces résultats, la présence de catéchines libres n'a jamais été mise en évidence chez le type sauvage (contrairement à d'autres plantes qui produisent des PA), ce qui pose la question de la nécessité d'une enzyme à activité LAR pour catalyser la biosynthèse des PA chez *A. thaliana* (Tanner *et al.*, 2003).

Transporteur transmembranaire de type MATE (TT12)

L'implication d'un transporteur de type MATE (pour « Multidrug And Toxic compounds Extrusion ») dans la biosynthèse des PA a été révélée par le clonage du gène *TT12* d'*A. thaliana* (Debeaujon *et al.*, 2001 ; Marinova *et al.*, 2007 ; Zhao et Dixon, 2009). *TT12* présente une homologie de séquence avec des transporteurs d'origine bactérienne impliqués dans la détoxification de certains substrats comme les antibiotiques, il posséderait douze hélices transmembranaires. Chez le mutant *tt12*, une quantité faible de PA (ou de composés précurseurs) est synthétisée, mais s'accumule dans le cytoplasme au lieu de la vacuole ce qui suggère que *TT12* est impliqué dans le transport transmembranaire de ces composés. Le mode de reconnaissance des substrats n'est pas connu mais l'implication du glutathion dans ce transport n'est pas envisagée car ce mode de fonctionnement a été mis en évidence jusqu'à présent, uniquement avec des transporteurs de type ABC (transporteurs ATP-dépendants). C'est pourquoi il a été proposé que *TT12* puisse reconnaître des composés glycosylés, acylés ou malonylés et que le transport soit un antiport flavonoïde/H⁺, comme cela a été mis en évidence pour les transporteurs bactériens dont il est l'homologue.

Glutathion S-transférase (GST)

L'implication des enzymes de type GST dans la biosynthèse des flavonoïdes a été mise en évidence par la caractérisation des gènes *BZ2* et *AN9*, et de leur rôle dans l'accumulation des anthocyanes dans la vacuole, chez le maïs et le pétunia, respectivement (Marrs *et al.*, 1995 ; Alfenito *et al.*, 1998). Récemment, le clonage du gène *TT19* a révélé que chez *A. thaliana*, une GST homologue est impliquée dans la translocation des anthocyanes et des précurseurs des PA (Kitamura *et al.*, 2004). Dans les cellules de l'endothélium de *tt19*, des métabolites sont synthétisés mais ils ne remplissent pas la vacuole même s'ils semblent s'agréger avec des structures membranaires (pouvant être des vésicules de transfert de métabolites ; Kitamura *et al.*, 2004).

Le mécanisme d'action de *TT19* et des autres GST n'est pas connu. Il a été proposé que la conjugaison des flavonoïdes avec le glutathion puisse permettre leur transfert dans la vacuole via un transporteur de type ABC (ATP-dépendant ; Marrs *et al.*, 1995 ; Alfenito *et al.*, 1998). Pourtant, le seul transporteur isolé jusqu'à présent appartient à la famille de transporteurs de type MATE (*TT12*), qui ne sont pas connus pour utiliser ce type de substrats (Debeaujon *et al.*, 2001). En plus des différences observées dans le phénotype de *tt19* et *tt12*, ces contradictions pourraient indiquer que *TT19* et *TT12* agissent à des étapes différentes du transport des PA ou de leurs précurseurs vers la vacuole.

3.2.4 Autres étapes de la biosynthèse des PA

Plusieurs résultats suggèrent que des étapes enzymatiques supplémentaires spécifiques de la biosynthèse des PA restent à découvrir. Tout d'abord, la surexpression de *BAN* même si elle permet la synthèse de précurseurs (épicatéchine), n'est pas suffisante pour induire la production ectopique des PA (Xie *et al.*, 2003 ; Tanner *et al.*, 2003). Plusieurs enzymes pourraient être nécessaires à la polymérisation des unités de flavan-3-ols (Kristiansen, 1984) et à certaines modifications du noyau flavonoïde (glycosylation par exemple). Enfin, il est possible que plusieurs éléments soient impliqués dans le transport des PA ou de leurs précurseurs vers la vacuole, en collaboration avec *TT12* et *TT19*.

3.2.5 Localisation de la voie de biosynthèse des PA

Spécificité tissulaire de la production des PA chez A. thaliana

La production des PA chez *A. thaliana* se limite aux téguments de la graine au contraire de nombreuses espèces végétales qui sont connues pour accumuler ces composés aussi dans les feuilles (plantes de la famille des Légumineuses). Les téguments ont une origine maternelle et leur formation s'effectue au cours du développement de l'ovule à partir des tissus composant la chalaze (Figure 3). La synthèse des PA y débute après la fécondation de l'ovule dans des cellules du micropyle (région 1, Figure 4). Elle s'étend progressivement à l'ensemble de l'endothélium (couche ii1 ou région 2, Figure 4) puis au faisceau de cellules pigmentées de la chalaze (région 3, Figure 4). Cette biosynthèse coïncide avec les premières étapes du développement de l'embryon (jusqu'au stade cœur) et elle s'accompagne d'une profonde modification morphologique des cellules qui accumulent les PA. Ces cellules se spécialisent véritablement dans la production de ces composés, avec notamment la formation d'une grande vacuole qui occupe la majeure partie de l'espace cellulaire (Debeaujon *et al.*, 2003).

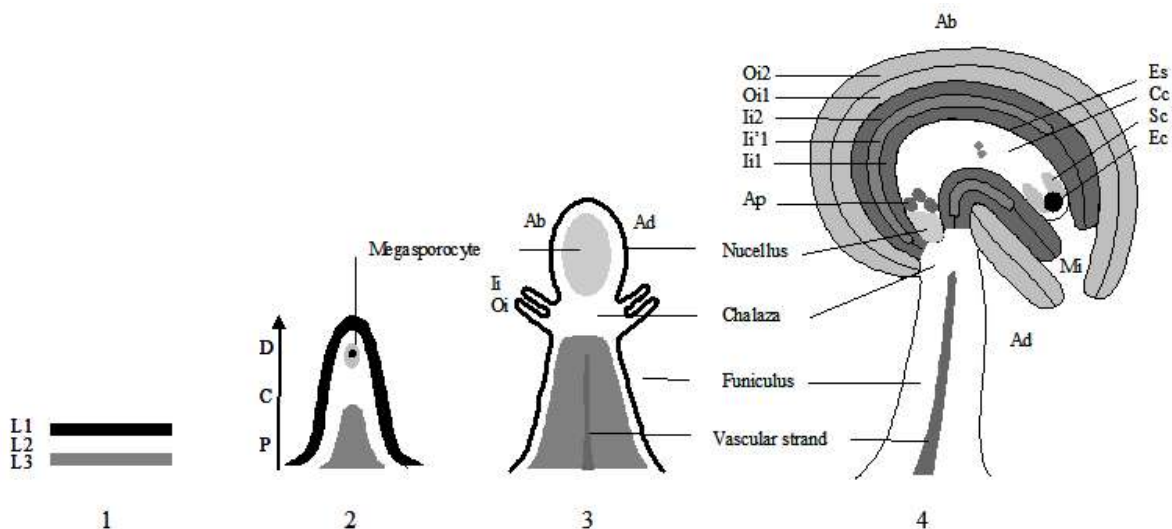


Figure 3 : Développement de l'ovule et origine des téguments chez *A. thaliana* (Lepiniec *et al.*, 2004)

L'ovule est formé à partir du placenta par des divisions péricleines de la couche épidermique L1 et des couches sub-épidermiques L2 et L3 (1, 2). Le primordium de l'ovule se développe suivant un axe proximal-distal (P-C-D). A l'extrémité distale, le nucelle donne naissance au mégasporocyte à l'origine du sac embryonnaire (Es). A partir de la chalaze, se forment les téguments internes (Ii) et les téguments externes (Oi) qui ont une origine épidermique (3). Le deuxième axe de développement de l'ovule est un axe abaxial-adaxial (Ab-Ad) perpendiculaire à l'axe proximal-distal. A maturité (4), le sac embryonnaire se compose de sept cellules, l'oosphère (Ec), deux synergides (Sc), la cellule centrale (Cs) et trois antipodes (Ap). Le développement asymétrique des téguments, avec une forte extension au pôle abaxial et dans une moindre mesure au pôle adaxial, provoque le rapprochement du micropyle (Mi) et du funicule qui deviennent alors adjacents.

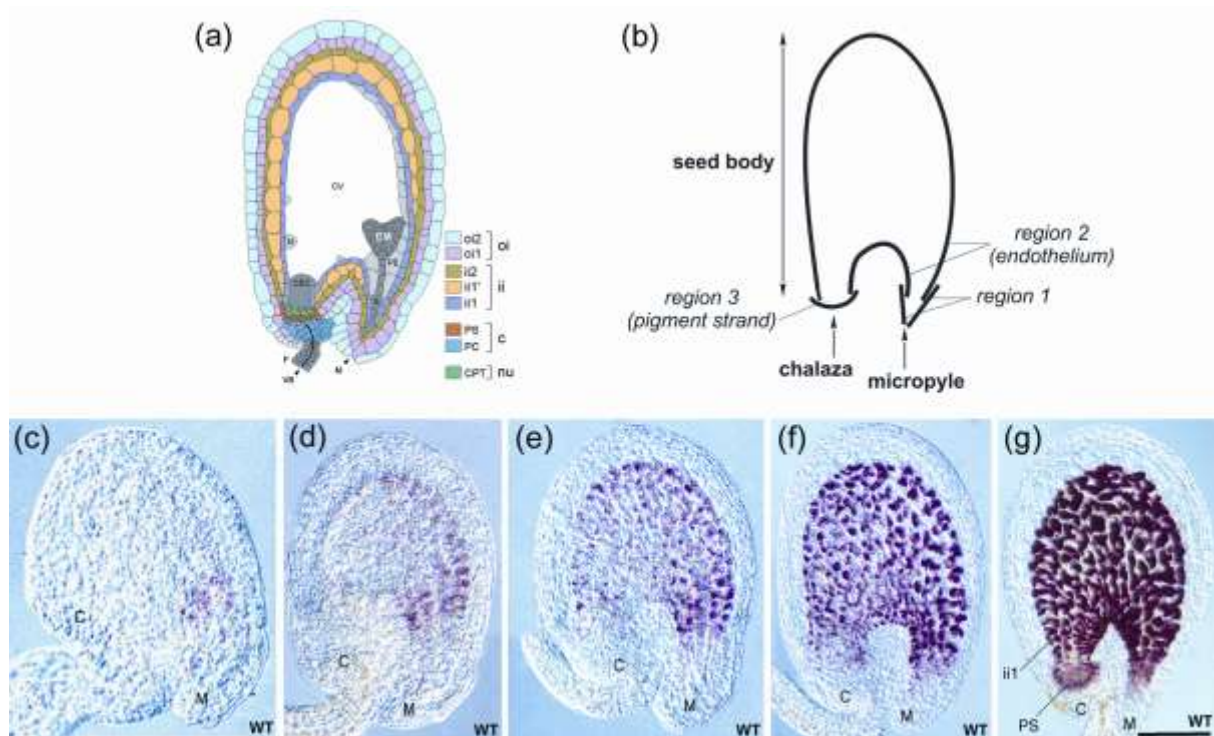


Figure 4 : Localisation de la production des PA dans la graine d'*A. thaliana* (Debeaujon *et al.*, 2003)

(a) Structure de la graine d'*A. thaliana* au stade cœur du développement de l'embryon. L'endothélium correspond à la couche cellulaire iii1. (b) Schéma montrant l'organisation de l'endothélium en trois régions en fonction du mode de régulation de l'accumulation des PA. (c-g) Profil d'accumulation des PA (coloration à la vanilline) au cours du développement de la graine aux stades deux cellules (c), globulaire précoce (d), globulaire (e), cœur précoce (f) et cœur (g).

C, chalaze ; CV, vacuole centrale ; CEC, albumen chalazal ; CPT, zone proliférative de la chalaze ; EM, embryon ; ii, tégument interne ; F, funicule ; M, micropyle ; N, nodule ; nu, nucelle ; oi, tégument externe ; PC, placentochalaze ; PE, albumen périphérique ; PS, zone pigmentée de la chalaze ; S, suspenseur ; VB, faisceau vasculaire ; WT, type sauvage.

Localisation sub-cellulaire de la biosynthèse des PA

Les principales données concernant la localisation sub-cellulaire de la biosynthèse des PA proviennent de l'étude des enzymes intervenant dans les étapes précoces de la voie. Des études de fractionnement cellulaire et d'immunolocalisation ont permis de montrer que la CHS est associée avec la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique où elle est présente sous forme de dimères (Hrazdina *et al.*, 1987). Cette localisation serait la conséquence d'une interaction avec les autres enzymes de biosynthèse, dont certaines comme la F3'H utilisent un cofacteur à cytochrome P450 et sont ancrées dans le réticulum endoplasmique (Stafford, 1990 ; Figure 5). Plusieurs interactions ont été mises en évidence entre la CHS, la CHI et la F3H par la technique du double hybride et par des expériences de co-purification de complexes protéiques (Burbulis et Winkel-Shirley, 1999). Ces résultats suggèrent une association globulaire des enzymes plutôt que linéaire car des interactions ont aussi été détectées entre des enzymes qui catalysent des réactions qui ne sont pas consécutives dans la voie comme entre la DFR et la CHS (Burbulis et Winkel-Shirley, 1999). Une telle organisation des enzymes pour la formation de métabolons a déjà été décrite pour de

nombreuses voies du métabolisme primaire comme par exemple pour les enzymes de la glycolyse, du cycle de Krebs et du cycle de Calvin (Ovadi et Srere, 2000 ; Winkel, 2004). Cela permet d'augmenter le rendement d'une chaîne de réactions enzymatiques en canalisant directement les substrats entre deux réactions et en séquestrant des composés intermédiaires très réactifs ou toxiques. Cette organisation permet aussi de favoriser une accumulation des produits dans certains domaines sub-cellulaires. Ainsi, dans le cas de la production des PA, une certaine proximité avec le réticulum endoplasmique permettrait de canaliser le transfert des précurseurs (flavan-3-ols) vers la vacuole par un système spécifique de transport dans des vésicules (Abrahams *et al.*, 2003). Les réactions finales de polymérisation auraient lieu dans la vacuole (Debeaujon *et al.*, 2001).

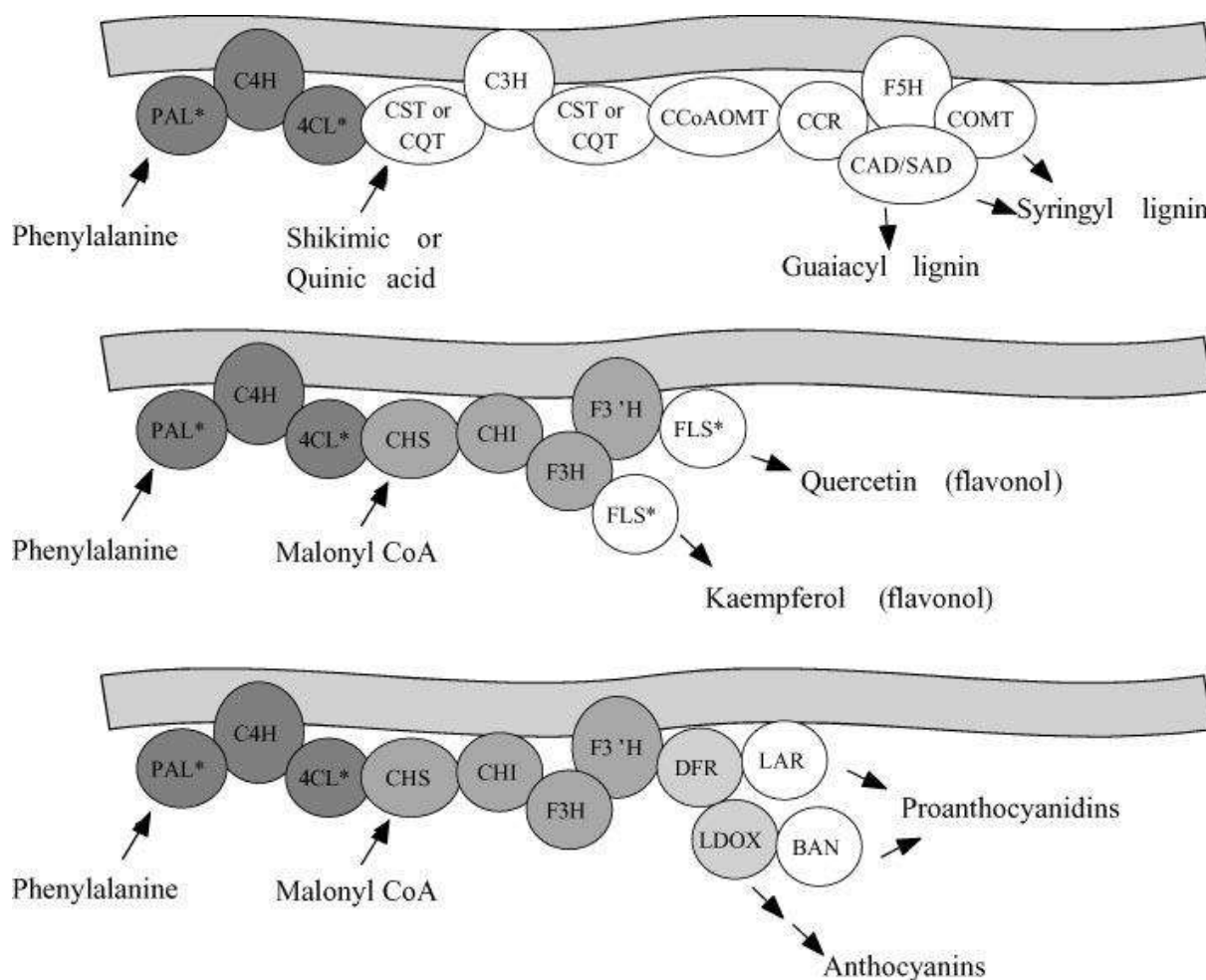


Figure 5 : Schématisation de l'organisation de la biosynthèse des lignines et des flavonoïdes au niveau de la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique (Winkel, 2004)

Les enzymes communes à plusieurs voies sont dans la même teinte de gris alors que les enzymes caractéristiques d'une seule voie sont en blanc. Les enzymes présentant plusieurs isoformes sont marquées par un astérisque (PAL, 3 gènes ; 4CL, 2 gènes ; FLS, 4 gènes dont 2 pseudogènes). Les hydroxylases à cytochrome P450 (C4H, C3H, F5H et F3'H) qui semblent être à l'origine de la localisation sub-cellulaire de ces voies de biosynthèse, sont représentées ancrées dans la membrane du réticulum endoplasmique.

Deux conséquences biotechnologiques importantes découlent de cette organisation du métabolisme secondaire en métabolons. Tout d'abord, cela permet d'expliquer en partie l'échec des stratégies visant à augmenter le rendement d'une voie métabolique uniquement par la surexpression d'une des enzymes de la voie, par exemple, la CHS ou la CHI pour la biosynthèse des flavonoïdes (Dong *et al.*, 2001). En effet, dans le cas d'une étape enzymatique non limitante, le surplus d'enzyme produit reste sans conséquences car il est dépendant des autres composants de la voie. D'autre part, cette organisation doit être prise en compte lorsqu'on cherche à détourner certaines voies métaboliques. Ainsi, des essais de production d'isoflavonoïdes chez *A. thaliana* par expression de l'isoflavone synthase (IFS) ont été effectués (Liu *et al.*, 2002). Cette enzyme utilise pour substrat la naringénine et elle entre donc en compétition avec les enzymes de la production des flavonols et des anthocyanes. De ce fait, seulement des faibles quantités d'isoflavonoïdes ont été obtenues lors de l'expression de l'IFS chez le type sauvage. Au contraire une augmentation significative du rendement a été observée par introduction du transgène chez le double mutant *tt3* x *tt6*, où l'absence de la F3H permet un meilleur accès de l'IFS à son substrat.

3.3 LA REGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES PA

3.3.1 Généralités

L'étude de la régulation de la biosynthèse des PA a connu une avancée considérable ces dernières années, par la caractérisation de plusieurs gènes codant pour des facteurs de transcription ou d'autres types de protéines de régulation chez *A. thaliana* (Marles *et al.*, 2003 b). Les régulateurs spécifiques : TT2, TT1 et TT16 semblent être uniquement impliqués dans la régulation de l'accumulation des PA dans la graine. Alors que les régulateurs non spécifiques : TT8, TTG1 et TTG2 participent à la régulation d'autres voies (comme par exemple l'accumulation des anthocyanes ou la production des trichomes).

3.3.2 Les régulateurs spécifiques

TT2

Le gène *TT2* (At5g35550) a été cloné grâce à la caractérisation de l'allèle *tt2-3* isolé de la banque de mutants d'ADN-T de l'INRA de Versailles (Nesi *et al.*, 2001). Cet allèle présente un phénotype *tt* caractéristique de la mutation *tt2* avec des graines de couleur jaune

clair. L'analyse de l'expression de *TT2* par RT-PCR semi-quantitative a révélé une expression limitée aux fleurs et aux siliques en développement (Nesi *et al.*, 2001). La réalisation de fusions traductionnelles entre un fragment de 2 kb du promoteur de *TT2* et le gène rapporteur *uidA* a permis de préciser cette expression (Figure 6 ; Debeaujon *et al.*, 2003). Une forte activité GUS a été détectée dans les cellules de l'endothélium, tout d'abord au pôle micropylaire puis au pôle chalazal de graines jeunes (déclenchement par la fertilisation de l'ovule). Cette activité s'étend ensuite progressivement à tout l'endothélium (stade coeur). En dehors de la graine, une activité GUS a également été détectée dans les faisceaux vasculaires des feuilles et des bourgeons, et dans les anthères.

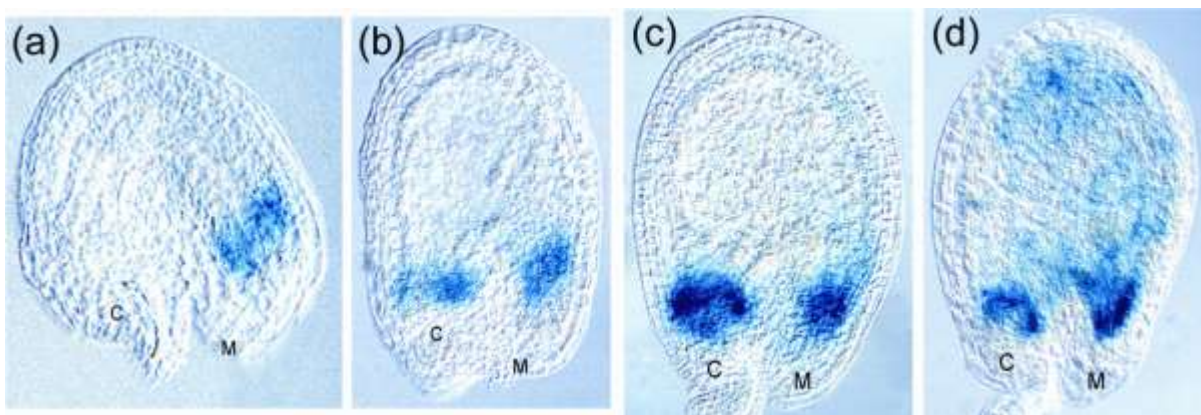


Figure 6 : Activité du promoteur de *TT2* au cours du développement de la graine d'*A. thaliana* (Debeaujon *et al.*, 2003)

La spécificité de l'expression de *TT2* a été révélée par l'activité GUS générée par un construit *TT2:uidA*. Des graines entières à différents stades de développement ont été observées à l'objectif Nomarski, après coloration.

(a) Stade suivant la fertilisation de l'ovule ; (b) Stade quatre cellules ; (c) Stade globulaire précoce ; (d) Stade globulaire tardif.

TT2 code pour une protéine de 258 aa (29,6 kDa ; pI = 8,9) appartenant à la classe des facteurs de transcription de type R2R3-MYB (*TT2* correspond à AtMYB123). Le domaine R2R3-MYB est un domaine d'interaction avec l'ADN et d'interaction avec des partenaires protéiques (Grotewold *et al.*, 2000). Il est localisé dans la partie N-terminale de la protéine et il se compose de la répétition imparfaite d'une séquence de 53 aa présentant 3 résidus W régulièrement espacés et responsables d'une structure tridimensionnelle particulière en hélice-hélice-tour-hélice (Dubos *et al.*, 2010 ; Stracke *et al.*, 2001). En accord avec une fonction de facteur de transcription, une fusion traductionnelle *TT2-GFP* a montré une localisation strictement nucléaire (Nesi *et al.*, 2001). De plus, on retrouve dans la partie C-terminale de la protéine (aa 220 à 227 et 250 à 258) des aa pouvant être impliqués dans la formation d'hélices α amphipolaires, caractéristiques de certains domaines d'activation de la transcription (Nesi *et*

al., 2001). Plusieurs cibles de TT2 ont été identifiées, il s'agit principalement d'enzymes intervenant dans des étapes tardives, spécifiques de la voie de biosynthèse des PA : *DFR*, *LDOX*, *BAN* et *TT12* (Figure 7 ; Nesi *et al.*, 2001). Cependant, des résultats récents indiquent que TT2 serait également impliqué dans l'activation de l'expression du gène *TT8* (Baudry *et al.*, 2006 ; §7), et ceci de façon redondante avec un autre facteur MYB : MYB5 (Gonzalez *et al.*, 2009).

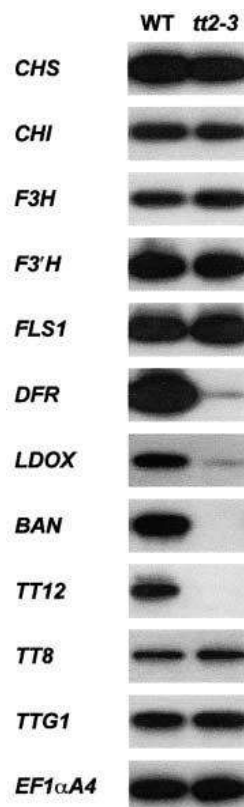


Figure 7 : Gènes cibles de TT2 (Nesi *et al.*, 2001)

L'expression de plusieurs gènes codant pour des enzymes ou des protéines de régulation de la biosynthèse des PA a été étudiée par RT-PCR semi-quantitative chez le type sauvage et chez le mutant *tt2-3*. Les résultats montrent une dérégulation chez le mutant des gènes *DFR*, *LDOX*, *BAN* et *TT12* qui codent tous pour des enzymes intervenant tardivement dans la voie. *EF1 α A4* a été utilisé comme contrôle.

TT1

Le gène *TT1* (At1g34790) a été cloné par la caractérisation du mutant *tt1-2* obtenu par mutagenèse avec le transposon de maïs *Enhancer-1* (Sagasser *et al.*, 2002). Le mutant *tt1* présente des graines de couleur jaune, néanmoins, des PA sont présentes en quantité faible aux pôles chalazal et micropylaire de la graine mature (région 1 et 3 de la Figure 4b). La biosynthèse des autres flavonoïdes ne semble pas être affectée. L'analyse au microscope de coupes de graines de *tt1* a révélé une morphologie altérée de l'endothélium dans ce mutant qui

ne peut pas s'expliquer seulement par l'absence des PA car le mutant *tt4* étudié en parallèle ne présentait pas ces altérations (Sagasser *et al.*, 2002). L'analyse par RT-PCR de l'expression de *TT1* a montré que celle-ci est limitée aux fleurs et aux siliques en développement (Figure 8 ; Sagasser *et al.*, 2002). La réalisation de fusions traductionnelles entre un fragment de 1,1 kb du promoteur de *TT1* et le gène *uidA* a confirmé cette spécificité d'expression en montrant une activité GUS importante dans l'ensemble des téguments de la graine (Figure 8 ; Sagasser *et al.*, 2002).

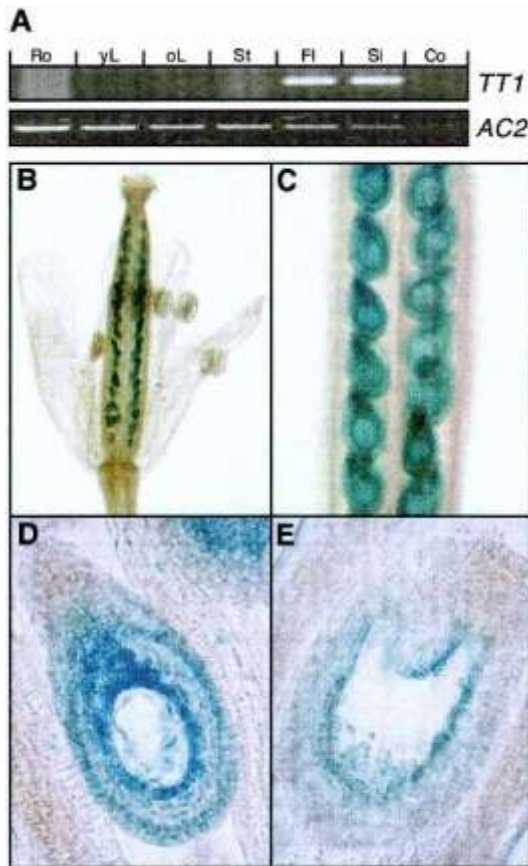


Figure 8 : Expression de *TT1* dans les graines d'*A. thaliana* (Sagasser *et al.*, 2002)

A, Caractérisation de l'expression de *TT1* par RT-PCR dans différents organes (Ro, racines ; yL, feuilles jeunes ; oL, feuilles âgées ; St, bourgeons ; Fl, fleurs ; Si, siliques ; Co, pas d'échantillon). Le gène *AC2* (*ACTIN2*) a été utilisé comme contrôle.

B-E, Analyse de l'activité *in planta* d'une fusion transcriptionnelle entre le promoteur de *TT1* et le gène rapporteur *uidA* dans les fleurs (B-C) et précision des domaines d'expression dans les graines après la réalisation de coupes longitudinales (D-E).

TT1 code pour une protéine de 303 aa (34,5 kDa ; pI = 7,5) qui présente deux motifs en doigt de zinc similaires à ceux caractérisés initialement dans le facteur général de la transcription TFIIA (Sagasser *et al.*, 2002 ; Appelhagen *et al.*, 2010). Ces deux motifs sont espacés d'une longue séquence de 63 aa, ce qui est caractéristique des protéines en doigt de zinc présentes chez les plantes. Le premier motif (partie N-terminale de la protéine) est de type C2H2 alors que le second motif (partie C-terminale) est un motif imparfait de type C2HC. Par comparaison avec les autres protéines présentant des doigts de zinc, une séquence très conservée de 156 aa comprenant ces motifs C2H2 et C2HC a permis de définir une sous-famille appelée « WIP », par le nom des trois aa commençant cette séquence consensus. Cette sous-famille compterait six membres chez *A. thaliana* (*TT1* et *AtWIP2* à 6).

La fonction de TT1 n'est pas connue, les domaines en doigts de zinc peuvent être impliqués dans plusieurs types d'interactions : interactions avec l'ADN, des ARN ou des protéines. Une fusion traductionnelle TT1-GFP a montré une localisation strictement nucléaire dans des protoplastes d'*A. thaliana*, ce qui suggère que TT1 pourrait être un facteur de transcription (Sagasser *et al.*, 2002). L'expression ectopique de TT1 sous la dépendance du promoteur 35S provoque la formation de cotylédons étroits et allongés, un retard de floraison et la formation de fleurs sans pédicel, le plus souvent stériles (Sagasser *et al.*, 2002). Cette perturbation du développement indique que, dans ces plantes, TT1 pourrait interférer avec plusieurs voies intervenant dans la différenciation des organes végétaux. En accord avec le phénotype de *tt1* qui montre une morphologie altérée de l'endothélium, cette dernière constatation a permis d'avancer que TT1 serait impliqué dans la régulation du développement de l'endothélium pour permettre l'accumulation des PA (Sagasser *et al.*, 2002).

TT16

Le gène *TT16* (At5g23260) a été cloné grâce à la caractérisation du mutant *tt16-1* isolé de la banque de mutants d'ADN-T de l'INRA de Versailles (Nesi *et al.*, 2002). Le phénotype de ce mutant présente des points communs avec le mutant *tt1* puisqu'une faible quantité de PA persiste dans la graine (région 1 et 3 de la Figure 4b) et une perturbation du développement de l'endothélium a été décrite. Les cellules de l'endothélium sont plus allongées chez *tt16* et elles présentent une structure irrégulière. Les PA qui sont produites, sont accumulées à la périphérie des cellules au lieu d'être concentrées dans une vacuole centrale comme c'est le cas chez le sauvage (Nesi *et al.*, 2002). L'analyse de l'expression de *TT16* a montré l'existence de deux transcrits ayant une séquence de 15 pb de différence, résultant de l'épissage alternatif du quatrième exon de ce gène. Ces deux transcrits sont exprimés simultanément et spécifiquement dans les boutons floraux, les fleurs et les siliques en développement (Figure 9 ; Nesi *et al.*, 2002).

TT16 code pour deux protéines de 247 aa (29,7 kDa ; pI = 6,4) et 252 aa (29 kDa ; pI = 6,5) qui comportent un domaine de type MADS de 56 aa à l'extrémité N-terminale (Nesi *et al.*, 2002). Ce domaine est généralement impliqué dans des interactions avec l'ADN et dans des dimérisations. La différence de séquence entre ces deux protéines touche le domaine K, avec la présence de 5 aa supplémentaires (NELMQ) en position 142 de la protéine. Le domaine K est également un domaine de dimérisation fonctionnant par l'interaction avec

d'autres domaines K. Dans la région C-terminale, de nombreux résidus Q et P pourraient être responsables de la présence d'un domaine d'activation de la transcription (Nesi *et al.*, 2002).

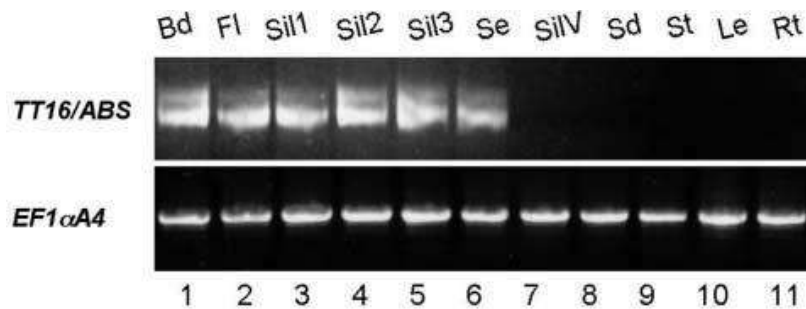


Figure 9 : Analyse de l'expression de *TT16* chez *A. thaliana* (Nesi *et al.*, 2002)

L'expression de *TT16* a été étudiée par RT-PCR sur des extraits d'ARN totaux obtenus à partir de différents organes : Bd, bouton floral ; Fl, fleur ; Sil1, siliques 1 et 2 jours après pollinisation ; Sil2, siliques 3 à 5 jours après pollinisation ; Sil3, siliques 6 à 10 jours après pollinisation ; Se, graine ; SilV, valves de la silique ; Sd, plantule de 4 jours ; St, bourgeon ; Le, feuilles de rosette ; Rt, racine. Le produit d'amplification est composé de deux bandes qui correspondent aux deux transcrits codés par *TT16*. Le gène *EF1αA4* a été utilisé comme contrôle.

L'expression ectopique de *TT16* sous la dépendance du promoteur *35S* provoque la formation de feuilles recourbées, un retard de floraison avec des fleurs le plus souvent stériles et des siliques rabougries (Nesi *et al.*, 2002). Ces différents phénotypes suggèrent que *TT16* est capable d'interférer avec des processus de différenciation cellulaire. En tenant compte également du phénotype du mutant qui présente une structure de l'endothélium altérée, ces résultats suggèrent que *TT16* est impliqué dans la régulation du développement de l'endothélium, comme cela a été proposé pour *TT1*.

3.3.3 Les régulateurs non spécifiques

TT8

Le gène *TT8* (At4g09820) a été cloné grâce à la caractérisation de l'allèle *tt8-3* issu de la banque de mutants d'ADN-T de l'INRA de Versailles (Nesi *et al.*, 2000). Le mutant *tt8* présente des graines de couleur jaune clair (absence de PA) et une réduction de la production des anthocyanes dans les cotylédons et dans les feuilles (Shirley *et al.*, 1995). La production de flavonols ne semble pas être affectée chez ce mutant. L'analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression de *TT8* a révélé la présence de transcrits dans les plantules et dans les siliques en développement (Figure 10 ; Nesi *et al.*, 2000). Dans la graine, cette expression semble stable au cours du développement et elle persiste jusqu'au stade embryon mature.

TT8 code pour une protéine de 518 aa (58,3 kDa ; pI = 5,7) qui présente dans sa partie N-terminale un domaine de type bHLH (pour « basic Helix-Loop-Helix »), responsable d'une structure tridimensionnelle en domaine basique-hélice-boucle-hélice. Ce motif est caractéristique de nombreux facteurs de transcription et il a été décrit à l'origine dans les protéines animales de type MYC (Massari et Murre, 2000). En accord avec cette possible fonction de facteur de transcription, *TT8* est impliqué dans la régulation de l'expression de *DFR* dans les plantules et dans les graines (Shirley *et al.*, 1995 ; Nesi *et al.*, 2000), et de *BAN* et *LDOX* dans les graines (Nesi *et al.*, 2000 ; Abrahams *et al.*, 2003).

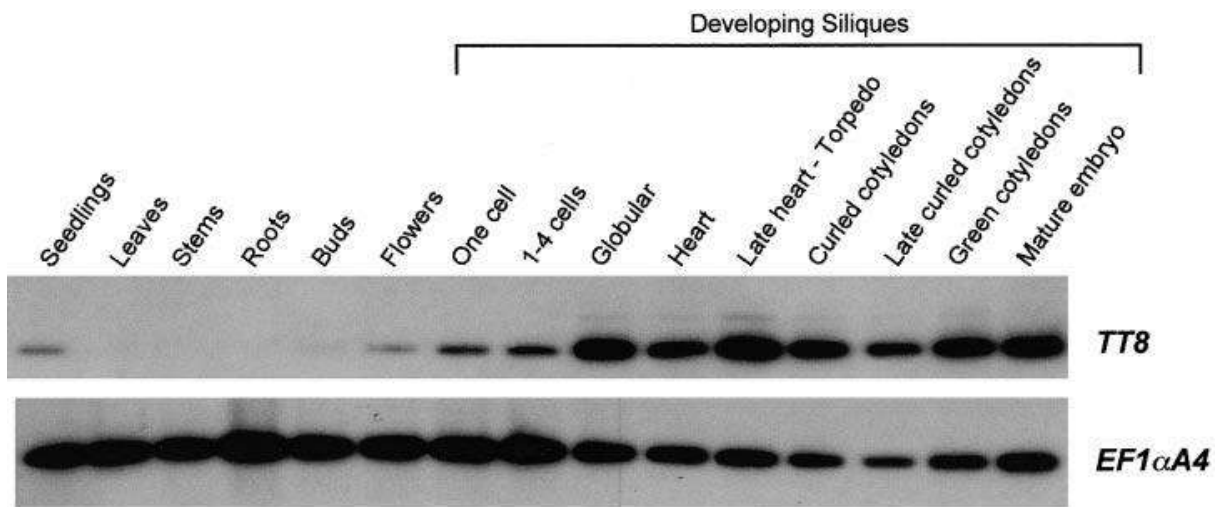


Figure 10 : Expression de *TT8* chez *A. thaliana* (Nesi *et al.*, 2000)

La présence des transcrits du gène *TT8* a été étudiée par RT-PCR semi-quantitative dans les plantules âgées de 4 jours (stade « seedling »), dans les feuilles de rosette, les bourgeons et les racines de plantules âgées de 10 jours, et dans les organes reproducteurs (boutons floraux, fleurs et siliques en développement). *EF1αA4* a été utilisé comme contrôle.

TTG1

Le gène *TTG1* (At5g24520) a été isolé par clonage positionnel de la mutation de l'allèle *ttg1-1* (Walker *et al.*, 1999). Le phénotype de *ttg1* est complexe, en effet, plusieurs voies sans lien apparent sont affectées chez ce mutant. Il présente des graines de couleur jaune clair (absence de PA) qui n'accumulent pas de mucilages dans le tégument externe. Les plantules ne présentent pas d'anthocyanes dans les cotylédons, les feuilles et les bourgeons alors que la production de flavonols ne semble pas être affectée. Les feuilles et les bourgeons sont glâbres (absence de trichomes) et, au contraire, les racines produisent des poils racinaires supplémentaires. L'analyse de l'expression de *TTG1* en « Northern » révèle une expression ubiquitaire car il a été détecté dans tous les organes testés (Figure 11 ; Walker *et al.*, 1999).

TTG1 code pour une protéine de 341 aa (37,9 kDa ; pI = 4,5) présentant plusieurs répétitions WD (Walker *et al.*, 1999). Ce motif peu conservé, est constitué de répétitions d'un domaine de 40 aa environ, terminé par les résidus WD. Ce domaine serait responsable de la formation d'une structure tridimensionnelle particulière appelée hélice β et favorisant les interactions avec de multiples partenaires protéiques (Van Nocker et Ludwig, 2003). *TTG1* ne présente pas de domaine de liaison à l'ADN, c'est pourquoi, il a été suggéré que ce soit une protéine de régulation de facteurs de transcription, plutôt qu'un facteur de transcription proprement dit (Walker *et al.*, 1999). *TTG1* est impliqué dans la régulation de l'expression de plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes : *DFR* dans les plantules et dans les graines (Shirley *et al.*, 1995 ; Nesi *et al.*, 2000), *BAN* dans les graines (Nesi *et al.*, 2000) et également dans la régulation de l'expression de *MUM4*, une enzyme impliquée dans la biosynthèse des mucilages de la graine (Western *et al.*, 2004).

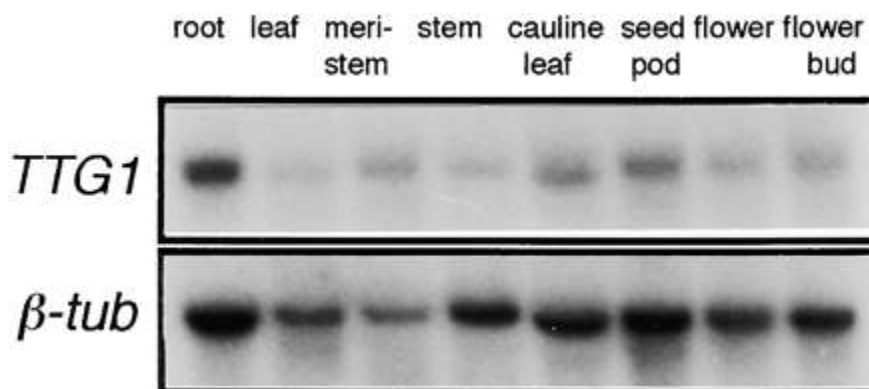


Figure 11 : Expression de *TTG1* chez *A. thaliana* (Walker *et al.*, 1999)

Les ARN totaux provenant de différents organes de plantules âgées de 4 semaines ont été hybridés par « Northern blot » avec la région codante du gène *TTG1* et une sonde spécifique du gène codant pour la β -tubuline (*β -tub*) utilisé comme contrôle.

TTG2

Le gène *TTG2* (At2g37260) a été cloné grâce à la caractérisation du mutant *ttg2-1* obtenu par mutagenèse avec le transposon Tag1 (Johnson *et al.*, 2002). Ce mutant présente un phénotype complexe, la plupart des voies affectées chez *ttg1* sont perturbées chez *ttg2*. Ses graines sont jaunes mais plus foncées que celles de *ttg1*, *tt2* ou *tt8*. Cette différence de coloration serait liée à la présence de précurseurs de la biosynthèse des PA, que l'on peut mettre en évidence par une réaction avec de la vanilline (Johnson *et al.*, 2002). Les mucilages sont absents du tégument externe. Par contre la production des anthocyanes ou de poils racinaires dans les plantules n'est pas affectée. En ce qui concerne les trichomes, ils sont initiés mais ils ne possèdent pas de ramifications et leur nombre est réduit de moitié.

L'analyse de l'expression de *TTG2* a été réalisée par hybridation *in situ* et par la réalisation de fusions traductionnelles entre un fragment de 2,2 kb du promoteur de *TTG2* et le gène *uidA* (Figure 12 ; Johnson *et al.*, 2002). Ces deux approches ont révélé une expression dans l'endothélium débutant dès la fertilisation puis s'étendant progressivement aux quatre autres couches de téguments. Une expression a aussi été détectée dans l'embryon. Dans les plantules, *TTG2* est exprimé dans les trichomes en formation, à la base des feuilles jeunes et dans les atrichoblastes de la zone d'élongation des racines. Dans un mutant *ttg1*, l'expression de *TTG2* est affectée, avec une absence d'activité GUS dans les feuilles et dans l'endothélium alors qu'elle persiste dans les autres téguments de la graine.

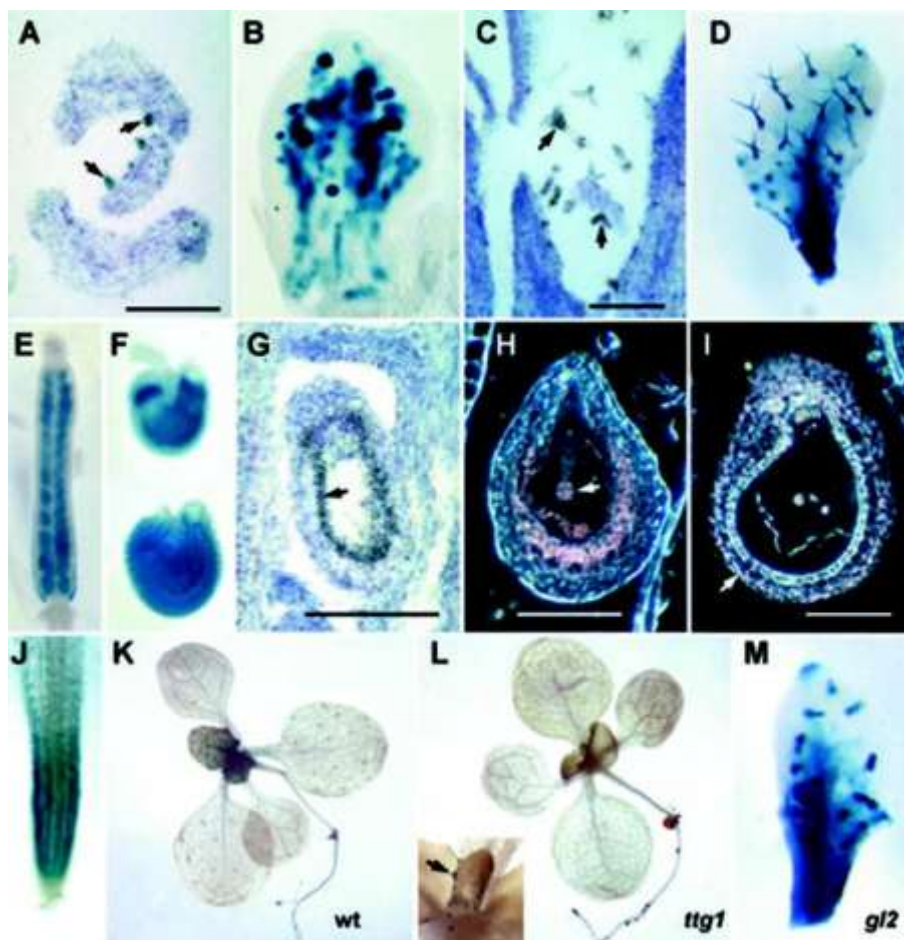


Figure 12 : Expression de *TTG2* chez *A. thaliana* (Johnson *et al.*, 2002)

L'expression de *TTG2* a été étudiée par des expériences d'hybridation *in situ* des ARNm avec une sonde antisens marquée au ^{35}S (A, C, G) et par l'étude de l'activité GUS générée par une fusion traductionnelle *TTG2:uidA* (B, D-F, H-M).

A, Section transversale de feuilles avec marquage des zones d'émergence des trichomes. B, Feuille en développement. C, Coupe longitudinale de l'apex d'une tige avec marquage des trichomes matures. D, Feuille entière. E, Silique en développement. F, G, H, I, Graines en développement. J, Pointe racinaire. K, L, Plantules âgée de 10 jours. M, Feuille d'une plantule *gl2* de 10 jours.

TTG2 code pour une protéine de 349 aa (38,7 kDa ; pI = 9,5) appartenant à la famille des facteurs de transcription de type WRKY (Johnson *et al.*, 2002). Le domaine WRKY est un domaine d'interaction avec l'ADN qui correspond à une séquence de 65-66 aa répétée deux fois dans la partie N-terminale de la protéine, commençant par les aa WRKYGQK et présentant un domaine en doigt de zinc de type C2H2. Plusieurs régions riches en S et T sont présentes dans la protéine *TTG2* et pourraient être caractéristiques de la présence de domaines d'activation de la transcription. Les cibles de *TTG2* ne sont pas connues, il a été proposé que *TTG2* agisse en aval de *TTG1* pour réguler la morphogénèse des trichomes, et la production des mucilages et des PA dans les graines (Johnson *et al.*, 2002).

3.3.4 La régulation de l'expression de *BAN*

Caractérisation de l'expression de BAN chez le type sauvage

L'expression de *BAN* a été caractérisée précisément par RT-PCR et par l'étude de l'activité GUS générée *in planta* par des fusions traductionnelles entre des fragments du promoteur de *BAN* et le gène rapporteur *uidA* (Debeaujon *et al.*, 2003). Les résultats de ces expériences ont montré que l'expression de *BAN* est limitée aux cellules qui accumulent les PA. Elle débute au niveau de certaines cellules du micropyle (région 1 de la Figure 4b) puis elle est activée dans des cellules de la chalaze (région 3 de la Figure 4b), les cellules placées sous le tissu germinatif de l'endosperme (embryon au stade 1 cellule). Après la fécondation de l'ovule, l'expression s'étend à l'ensemble de l'endothélium (région 2 de la Figure 4b), pour atteindre son niveau maximal au stade globulaire et au stade cœur du développement de l'embryon (Figure 13). Passé ce pic d'expression, le niveau de transcrit et l'activité du promoteur décroissent rapidement.

Profil d'expression de BAN chez les différents mutants de régulation de la biosynthèse des PA

L'analyse par RT-PCR semi-quantitative de l'expression de *BAN* dans les différents mutants de régulation de la biosynthèse des PA a permis de montrer que la transcription de ce gène est affectée chez les mutants *tt2*, *tt8*, *ttg1* et *tt1*. Aucun transcrit n'est détecté dans les extraits d'ARN issus de siliques de *tt2*, *tt8* et *ttg1* (Nesi *et al.*, 2000) alors que le niveau d'expression est plus faible dans les siliques de *tt1* (Sagasser *et al.*, 2002). Les fusions

traductionnelles entre le promoteur de *BAN* et le gène *uidA* ont été introduites par croisement dans ces mutants (Figure 14 ; Debeaujon *et al.*, 2003). Aucune activité GUS n'a pu être détectée dans *tt2* et *ttg1* confirmant que la transcription de *BAN* n'a pas lieu dans ces deux mutants. Dans le mutant *tt8*, aucune activité GUS n'est détectée dans les cellules du micropyle et de l'endothélium alors qu'elle persiste dans la chalaze. Cette activité résiduelle du promoteur de *BAN*, n'avait pas été détectée en RT-PCR semi-quantitative, ce qui indique qu'elle est probablement trop faible pour être détectée par cette méthode. Cependant, une faible stabilité des transcrits du gène *BAN* pourrait aussi être à l'origine de la différence observée entre les résultats obtenus par ces deux méthodes. Dans le mutant *tt1*, le promoteur n'est plus activé dans un groupe de cellules situé à la jonction entre la chalaze et l'endothélium, ce qui permettrait d'expliquer la baisse du niveau de transcrits *BAN* préalablement mise en évidence dans ces plantes (Sagasser *et al.*, 2002).

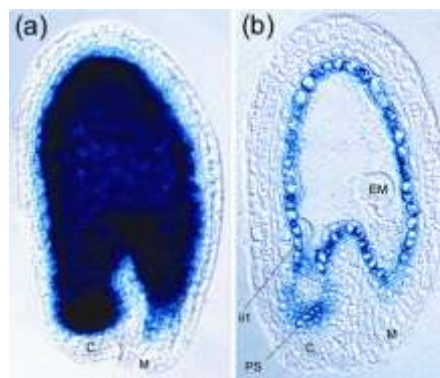


Figure 13 : Activité du promoteur de *BAN* dans les graines d'*A. thaliana* (Debeaujon *et al.*, 2003)

La spécificité tissulaire de l'expression de *BAN* dans la graine a été étudiée par la caractérisation de l'activité GUS générée par un construit *BAN:uidA*. (a) Graine entière au stade globulaire. (b) Section longitudinale de graine au stade globulaire.

C, chalaze ; EM, embryon ; ii, tégument interne ; M, micropyle ; PS, zone pigmentée de la chalaze.

L'effet de la mutation *tt16* sur le profil d'expression de *BAN* est plus complexe. Aucune modification du niveau de transcrits n'a pu être mise en évidence par RT-PCR semi-quantitative. Cependant, l'activité du construit *BAN:uidA* dans ce mutant montre une absence d'expression de *BAN* dans l'endothélium alors que celle-ci persiste au niveau du micropyle et de la chalaze. Cette perturbation du profil d'expression permet d'expliquer pourquoi des PA continuent à s'accumuler dans ces deux régions dans les graines du mutant. Cependant, une activation ectopique du promoteur se produit dans le tégument le plus externe, correspondant à la couche de cellules à mucilage. Ce dernier résultat suggère que suivant la couche cellulaire, *TT16* pourrait avoir un effet positif ou négatif sur l'expression de *BAN*.

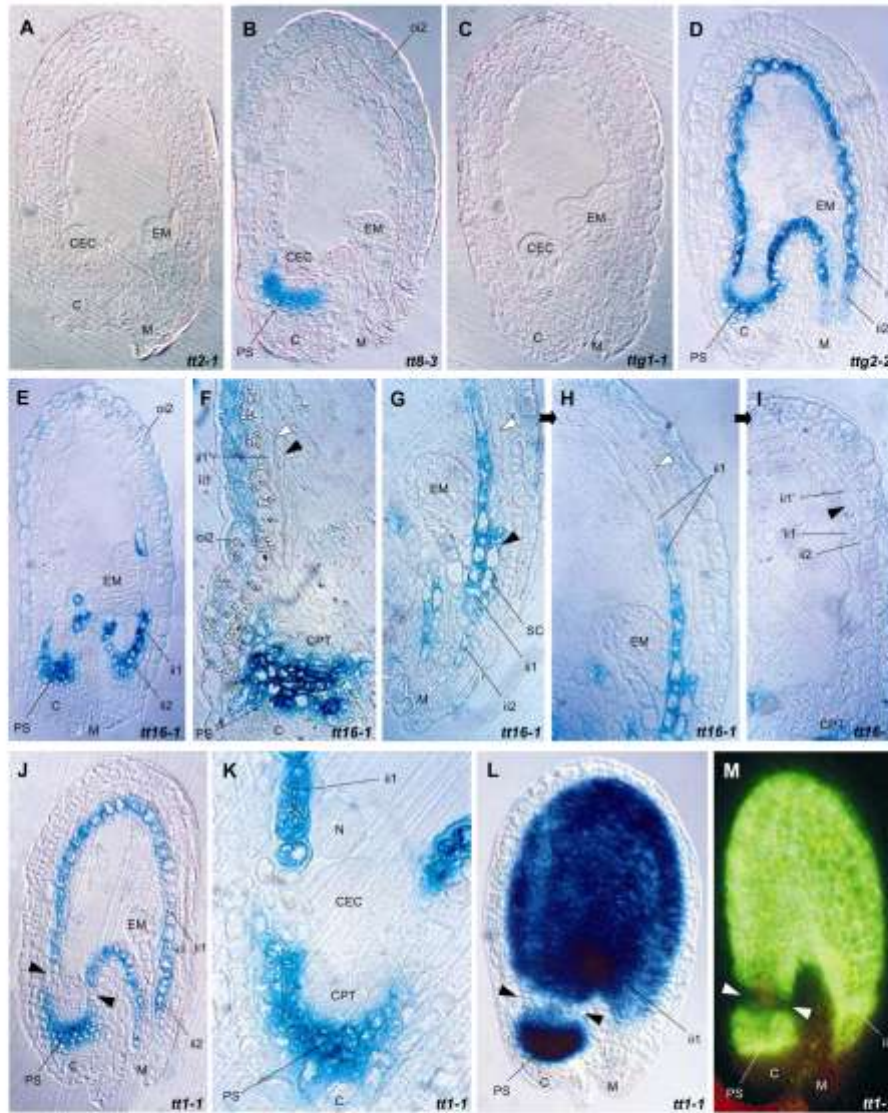


Figure 14 : Activité du promoteur de *BAN* dans les mutants de régulation de la production des PA (Debeaujon *et al.*, 2003)

L'activité du promoteur de *BAN* a été caractérisée par introduction de construits *BAN:uidA* (A-L) ou *BAN:mGFP5-ER* (M) dans les fonds génétiques mutants *tt2-1* (A), *tt8-3* (B), *ttg1-1* (C), *ttg2-2* (D), *tt16-1* (E-I) et *tt1-1* (J-M). F, les flèches montrent les cellules allongées avec une grande vacuole de la couche ii1 (flèche noire) et ii1' (flèche blanche). G à I, plusieurs vues de la même section longitudinale de graine montrant les cellules issues par une division péricline d'une cellule exprimant *uidA* (flèche noire) et les couches surnuméraires de cellules du tégument interne (flèche blanche) en G, les couches supplémentaires de cellules du tégument interne en H (flèche), et une division atypique d'une cellule de la couche ii1' en I (flèche). J et L-M, les flèches indiquent l'absence d'expression du gène rapporteur dans un groupe de cellules endothéliales. K, agrandissement de la région chalazale montrée en J. C, chalaze ; CEC, albumen chalazal ; CPT, zone proliférative de la chalaze ; EM, embryon ; ii, tégument interne ; M, micropyle ; N, nodule ; oi, tégument externe ; PS, zone pigmentée de la chalaze ; S, suspenseur ; SC, cellule surnuméraire.

4 DONNEES FONCTIONNELLES SUR LES PROTEINES MYB ET BHLH REGULANT LA BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES CHEZ LES PLANTES

4.1 GENERALITES SUR LE MODE D'ACTION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

4.1.1 Introduction

La régulation de l'expression des gènes chez les végétaux suit les mêmes règles que chez la plupart des eucaryotes, avec une forte implication des facteurs de transcription se liant à l'ADN de façon spécifique (Riechmann, 2002), classe à laquelle appartiennent les facteurs MYB et bHLH. Les autres classes de protéines comprennent les facteurs généraux de la transcription, les co-activateurs et les cofacteurs, et les protéines modifiant la structure de la chromatine, notamment par acétylation ou désacétylation des histones. De nombreux travaux ont mis en évidence l'importance des interactions protéine-protéine et d'autres mécanismes régulant l'activité, l'abondance et la localisation cellulaire des facteurs de transcription spécifiques pour la régulation de l'expression des gènes.

4.1.2 Facteurs de transcription et interactions protéine-protéine

Les facteurs de transcription sont impliqués dans des complexes protéiques appelés enhanceosomes qui régulent l'expression des gènes (Figure 15 ; Singh, 1998). La formation de ces complexes au niveau des séquences cis-régulatrices est le résultat d'interactions spécifiques entre plusieurs facteurs de transcription et parfois, certaines protéines régulatrices (co-régulateurs). Ce mécanisme de coopération permet aux protéines avec des domaines de liaison à l'ADN similaires d'acquérir une véritable spécificité par leur interaction avec certains partenaires (Grotewold *et al.*, 2000). Ces interactions permettent aussi d'expliquer pourquoi certains régulateurs ont des rôles multiples, en étant capables d'activer certaines cibles et d'en réprimer d'autres (Singh, 1998).

Les interactions entre facteurs de transcription peuvent concerner les membres d'une même famille ou bien les membres de familles différentes. Plusieurs régulateurs de la famille MADS sont capables de former des dimères et des hétérodimères (Riechmann, 2002). Par exemple, parmi les gènes cadastraux déterminant l'identité des organes floraux chez *A.*

thaliana, APETALA3 (AP3) et PISTILLATA (PI) se lient à l'ADN sous la forme d'un hétérodimère alors que AP1 et AGAMOUS (AG) peuvent se lier à la fois sous la forme d'un homodimère ou d'un hétérodimère formé avec d'autres protéines MADS. Cependant, l'activité de ces facteurs *in vivo* nécessite la présence de protéines supplémentaires appartenant aussi à la famille des facteurs MADS : SEPALLATA1-3 (SEP ; Pelaz *et al.*, 2000). La formation d'un complexe ternaire entre AP3, PI et SEP3 a été démontrée par des expériences de triple-hybride chez la levure, elle serait à l'origine de la spécificité d'action de ces molécules *in vivo*, dans l'activation de la formation des pétales (Honma et Goto, 2001). Un autre complexe de facteurs de transcription formé de AP3, Pi, SEP3 et AG serait responsable de la formation des étamines (Honma et Goto, 2001).

De la même façon, l'interaction entre des facteurs de type MYB et des facteurs de type bHLH est connue pour être nécessaire pour l'induction de la formation des trichomes (Payne *et al.*, 2000), pour réguler l'espacement des poils racinaires (Bernhardt *et al.*, 2003), pour induire l'expression des gènes régulés par l'acide abscissique (ABA) chez *A. thaliana* (Abe *et al.*, 2003), et pour l'induction de la biosynthèse des anthocyanes chez de nombreuses espèces (Mol *et al.*, 1998). Plusieurs interactions impliquant des facteurs de type bZIP et d'autres types de facteurs de transcription ont été décrites, par exemple entre ABI5 (bZIP) et ABI3 chez *A. thaliana* (Nakamura *et al.*, 2001) et entre OPAQUE2 (bZIP) et PBF (DOF) pour l'induction de la production des protéines de réserve chez le maïs (Vicente-Carbajosa *et al.*, 1997).

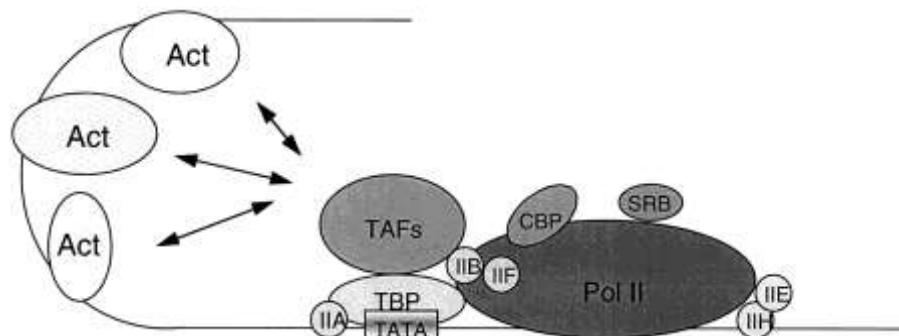


Figure 15 : Représentation schématique de l'initiation de la transcription des gènes par un enhanceosome chez les eucaryotes (Singh *et al.*, 1998)

L'assemblage du complexe initiateur de la transcription au niveau d'un promoteur contenant une TATA-box spécifique de l'ARN-polymérase II (Pol II) est représenté de façon schématique. Pol II et les facteurs généraux de la transcription IIA, IIB, IID (comprenant la TATA-box binding protein [TBP] et les « TBP-associated factors » [TAFs]), IIE, IIF, et IIF, ainsi que quelques autres facteurs (CBP et SRB) sont nécessaires. Les facteurs spécifiques de la transcription (ACT) se lient habituellement à l'ADN à des sites présents en amont de la TATA-box. Des interactions entre les domaines activateurs présents sur les ACT et la machinerie générale de transcription permettent de recruter ou de stabiliser le complexe d'initiation de la transcription.

4.1.3 Régulation de l'activité des facteurs de transcription

Les facteurs de transcription, comme la plupart des protéines, peuvent être la cible de modifications post-traductionnelles qui vont influencer leur conformation, leurs interactions avec des partenaires protéiques ou leur localisation sub-cellulaire. En conséquence, leurs propriétés de liaison à l'ADN et d'activation de la transcription, ou leur stabilité peuvent être modifiées (Vom Endt *et al.*, 2002). Un mécanisme de régulation bien décrit est celui de phosphorylation/déphosphorylation. Par exemple, l'activité de Pto-interactor4 (Pti4), un facteur de transcription de la famille AP2/ERF, est régulée par phosphorylation par le récepteur-kinase Pto. Cette modification de Pti4 se traduit par une augmentation de son affinité pour l'ADN (motif GCC), suggérant une augmentation de sa capacité à activer ses cibles *in vivo*, les gènes de résistance aux pathogènes chez la tomate (Gu *et al.*, 2000). Au contraire, la phosphorylation de AmMYB340, un facteur MYB impliqué dans la régulation du métabolisme des flavonoïdes chez le muflier, aurait un effet négatif sur son affinité pour l'ADN (Moyano *et al.*, 1996). Un autre exemple de modification post-traductionnelle ayant une influence sur l'activité des facteurs de transcription est l'isoprénylation. Cette modification est nécessaire à l'activité du facteur AP1 d'*A. thaliana* (Yalovsky *et al.*, 2000).

4.1.4 Régulation de l'abondance des facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont des protéines généralement instables, ce qui leur vaut notamment le qualificatif de protéines kamikazes (Thomas et Tyers, 2000). Cette instabilité s'explique par la nécessité pour la cellule de réguler finement le taux de ces protéines très actives. Des mécanismes spécifiques d'ubiquitination permettent d'orienter les facteurs de transcription vers une protéolyse par le protéasome 26S. D'une façon générale, l'ubiquitination se produit à la suite de l'activation de la machinerie de transcription et elle est liée à la présence d'un domaine d'activation dans la protéine (Salghetti *et al.*, 2001 ; Tansey, 2001). En effet, la plupart des domaines d'activation appartiennent à la classe des domaines induisant une dégradation rapide des protéines, les dégrons. Cependant, la dégradation peut se produire avant que le facteur de transcription ne puisse activer ses cibles. Ce mode de régulation négatif est fondamental chez les plantes, il est à la base de la régulation du cycle cellulaire, du mode d'action de certaines hormones et de la réponse des plantes à leur environnement (Smalle et Vierstra, 2004). Un mécanisme de régulation particulièrement bien décrit est celui de la stabilisation des facteurs de transcription HY5 (bZIP), HYH (bZIP) et

LAF1 (MYB) en réponse au signal lumineux. A l'obscurité, ces facteurs sont inhibés systématiquement par une ubiquitination induite par COP1, une ubiquitine-ligase de type E3 alors localisée dans le noyau (Hardtke et Deng, 2000 ; Seo *et al.*, 2003). Ils sont ensuite dégradés par le protéasome, même si une faible quantité de facteur peut persister sous forme phosphorylée inactive (Hardtke et Deng, 2000). En réponse à un stimulus lumineux, COP1 est exclue du noyau et HY5 et LAF1 peuvent alors activer leurs cibles à l'origine de la photomorphogénèse chez *A. thaliana*.

4.1.5 Diffusion des facteurs de transcription chez les plantes

L'analyse fonctionnelle de certains facteurs de transcription a montré que l'activité de ces protéines n'est pas forcément limitée aux cellules qui les expriment. Cet effet à courte distance serait directement lié à des mécanismes de diffusion ou de transport actif de ces protéines à travers les plasmodesmes des cellules végétales qui permettent une continuité entre le cytoplasme de cellules adjacentes (Haywood *et al.*, 2002 ; Wu *et al.*, 2002). Cette propriété a été mise en évidence pour plusieurs facteurs appartenant à des classes différentes mais qui sont tous impliqués dans la régulation du développement des plantes. Par exemple, l'importance de cette diffusion à travers les différentes couches cellulaires composant le méristème apical a été décrite dans le mécanisme d'action de KNOTTED1 (facteur à homéobox) chez le maïs, de DEFICIENS (facteur MADS) chez le muflier et de LEAFY chez *A. thaliana*. Dans le méristème racinaire, le facteur SHORTROOT (SHR, famille GRAS), impliqué dans le développement de l'endoderme, est exprimé uniquement dans la couche cellulaire adjacente, la stèle. Par contre, la présence de la protéine SHR a été révélée dans le cytoplasme et le noyau des cellules de la stèle et dans le noyau des cellules de l'endoderme, indiquant l'existence d'un mécanisme de transport actif de SHR de la stèle vers l'endoderme (Nakajima *et al.*, 2001).

4.2 IMPORTANCE DES FACTEURS MYB ET BHLH CHEZ LES PLANTES

4.2.1 Les MYB et les bHLH chez *A. thaliana*

Le séquençage du génome d'*A. thaliana* a révélé l'existence d'environ 1500 gènes codant pour des facteurs de transcription soit 6 % du nombre total de gènes (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Suivant leur domaine putatif d'interaction avec l'ADN, ces gènes ont été classés en 45 familles (Riechmann *et al.*, 2000). Avec respectivement 125 et 162 membres, les familles MYB et bHLH sont deux des familles les plus vastes rencontrées chez *A. thaliana* et des méthodes de génomique ont été mises en place pour l'analyse fonctionnelle de ces deux familles de facteurs de transcription (Dubos *et al.*, 2010 ; Heim *et al.*, 2003 ; Stracke *et al.*, 2001 ; Toledo-ortiz *et al.*, 2003).

4.2.2 Propriétés générales des facteurs de transcription de type MYB

Chez les plantes, la famille de facteurs de transcription présentant un domaine de liaison à l'ADN de type MYB a été très fortement amplifiée par rapport aux autres eucaryotes (levure et animaux) suggérant que ces facteurs sont impliqués principalement dans la régulation de processus spécifiques des végétaux (Riechmann, 2002). Notamment, des protéines MYB ont été mises en évidence dans la régulation du métabolisme primaire (synthèse du tryptophane) et du métabolisme secondaire (voie des phénylpropanoïdes), dans le contrôle du développement et de l'identité cellulaire, ou dans la réponse à l'environnement et aux hormones végétales (Tableaux 2 et 3).

Le domaine MYB, situé à l'extrémité N-terminale, est composé de répétitions imparfaites d'un domaine de liaison à l'ADN de 50-53 aa adoptant une structure caractéristique en hélice-hélice-tour-hélice (Dubos *et al.*, 2010 ; Stracke *et al.* 2001). Le premier facteur MYB décrit, c-MYB, a été isolé chez les mammifères et il présente trois répétitions du domaine MYB (R1, R2, et R3). Des homologues ont été identifiés chez les plantes et, comme c-MYB, ils sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Ito *et al.*, 2001). Les analyses phylogénétiques suggèrent que ces gènes à trois répétitions soient les gènes MYB ancestraux, obtenus par duplication du domaine MYB (Rosinski et Atchley, 1998). Puis la première répétition R1 aurait été perdue pour donner les premiers R2R3-MYB spécifiques des plantes et qui ont été ultérieurement fortement amplifiés.

Gène	Locus ID	AtMYB	Processus régulé	Référence
AS1	At2g37630	AtMYB091	Différentiation des cellules foliaires	Byrne <i>et al.</i> (2000)
AtMYB2	At2g47190	AtMYB002	Régulation de l'expression des gènes par l'ABA	Abe <i>et al.</i> (2003)
AtMYB4	At4g38620	AtMYB004	Répression du métabolisme des esters de l'acide sinapique	Jin <i>et al.</i> (2000)
AtMYB13	At1g06180	AtMYB013	Morphogénèse de la tige	Kirik <i>et al.</i> (1998)
AtMYB21	At3g27810	AtMYB021	Photomorphogénèse	Shin <i>et al.</i> (2002)
AtMYB23	At5g40330	AtMYB023	Différentiation des trichomes	Kirik <i>et al.</i> (2001)
AtMYB30	At3g28910	AtMYB030	Réponse d'hypersensibilité aux pathogènes	Vailleau <i>et al.</i> (2002)
AtMYB102	At4g21440	AtMYB102	Réponse à la blessure et aux stress osmotiques	Denekamp et Smeekens (2003)
AtMYB103	At1g63910	AtMYB103	Développement du tapetum et des trichomes	Higginson <i>et al.</i> (2003)
ATR1	At5g60890	AtMYB034	Régulation du métabolisme du tryptophane	Bender et Fink (1998)
GL1	At3g27920	AtMYB000	Initiation des trichomes	Oppenheimer <i>et al.</i> (1991)
MYB26	At3g13890	AtMYB026	Déhiscence des anthères	Steiner-Lange <i>et al.</i> (2003)
MYB61	At1g09540	AtMYB061	Production des mucilages de la graine, lignification	Penfield <i>et al.</i> (2001) Newman <i>et al.</i> (2004)
LAF1	At4g25560	AtMYB018	Voie de signalisation du phytochrome A	Ballesteros <i>et al.</i> (2001)
PAP1	At1g56650	AtMYB075	Métabolisme des anthocyanes	Borevitz <i>et al.</i> (2000)
PAP2	At1g66390	AtMYB090	Métabolisme des anthocyanes	Borevitz <i>et al.</i> (2000)
TT2	At5g35550	AtMYB123	Métabolisme des PA	Nesi <i>et al.</i> (2001)
WER	At5g14750	AtMYB066	Initiation des poils racinaires	Lee et Schiefelbein (1999)

Tableau 2 : Protéines à domaine R2R3-MYB caractérisées fonctionnellement chez *A. thaliana*

AS1, asymmetric leaves1 ; ATR, altered tryptophane regulation ; LAF1, long after far-red light1 ; PAP, production of anthocyanin pigment ; TT2, transparent testa2; WER, werewolf.

Gène	Locus ID	Particularités	Processus régulé	Référence
APL	At1g79430	domaines MYB et coil-coil	Développement du tissu vasculaire	Bonke <i>et al.</i> (2003)
MYBL2	At1g71030	une répétition MYB	Initiation des trichomes	Sawa (2002)
CCA1	At2g46830	une répétition MYB	Rythme circadien	Wang <i>et al.</i> (1997)
CPC	At2g46410	une répétition MYB	Production des poils racinaires et des trichomes	Wada <i>et al.</i> (1997)
EPR1	At1g18330	une répétition MYB	Rythme circadien	Kuno <i>et al.</i> (2003)
ETC1	At1g01380	une répétition MYB	Production des poils racinaires et des trichomes	Kirik <i>et al.</i> (2004)
LHY	At1g01060	une répétition MYB	Rythme circadien	Schaffer <i>et al.</i> (1998)
TRY	At5g53200	une répétition MYB	Production des poils racinaires et des trichomes	Schellmann <i>et al.</i> (2002)

Tableau 3 : Protéines MYB atypiques caractérisées fonctionnellement chez *A. thaliana*

APL, altered phloem development ; CCA1, circadian clock associated1 ; CPC, caprice ; EPR1, early phytochrome responsive1 ; ETC1, enhancer of TRY and CPC1 ; LHY, late elongated hypocotyl ; TRY, triptychon.

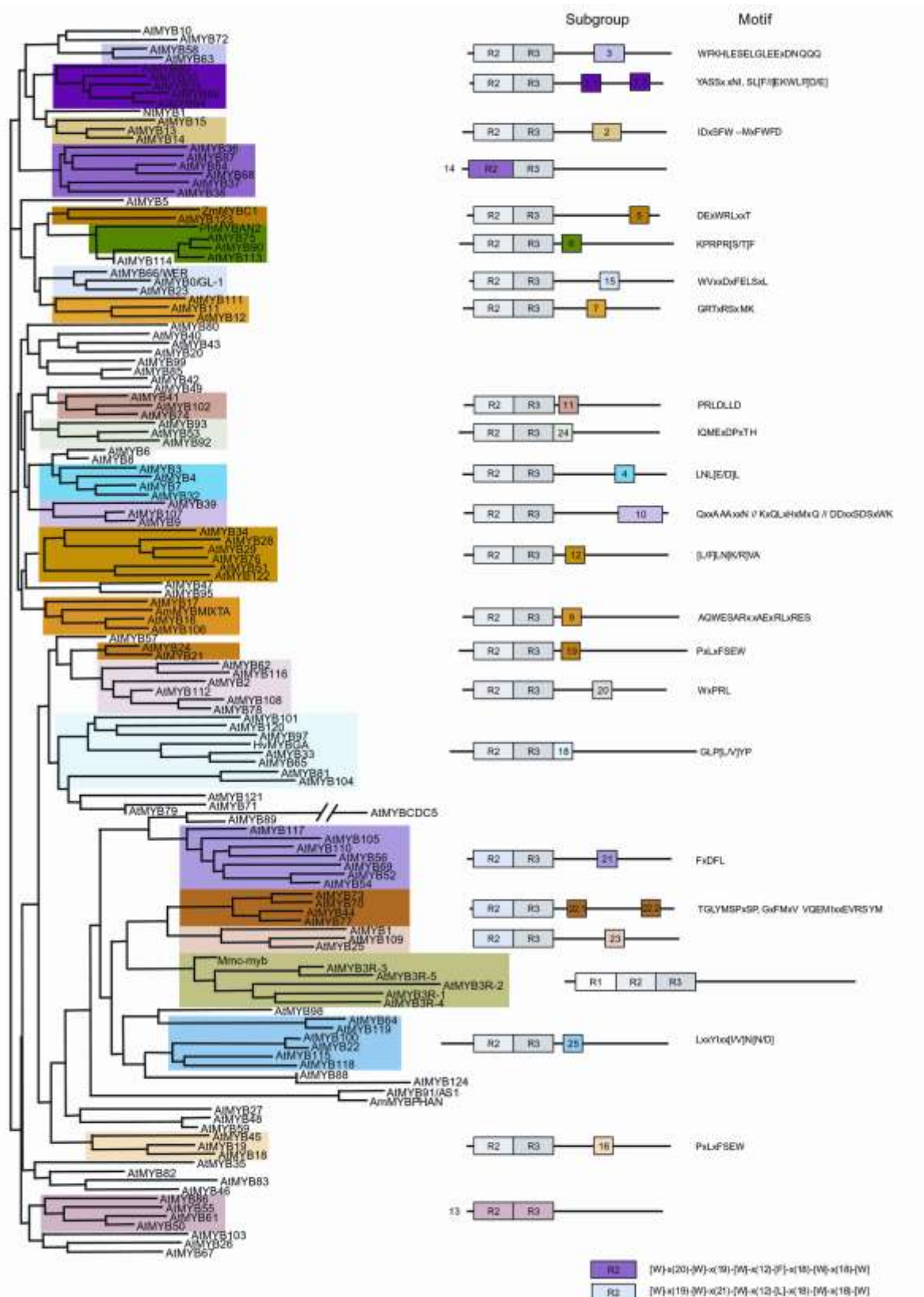


Figure 16 : Analyse phylogénétique de la famille des facteurs MYB d'*A. thaliana* (Stracke *et al.*, 2001)

Les relations phylogénétiques entre les facteurs MYB d'*A. thaliana* possédant deux et trois répétitions MYB sont représentées dans cet arbre, comprenant également certains facteurs MYB d'autres espèces (C1, AN2, AmMYBMIXTA, AmMYBPHAN, HvMYBGA, NtMYB1 et Mmc-Myb). L'analyse phylogénétique a été effectuée en utilisant le programme PHYLIP et les motifs conservés utilisés pour la définition des sous-groupes ont été déterminés avec le programme MEME. Pour plus de précisions, se reporter à Stracke *et al.*, 2001.

L'homologie de séquence en dehors du domaine MYB est assez faible mais elle a tout de même permis une classification de ces protéines en sous-groupes par l'identification de certaines séquences homologues pouvant présenter une similarité fonctionnelle (Figure 16 ; Dubos *et al.*, 2010 ; Stracke *et al.*, 2001). Par exemple, certains de ces domaines présents à l'extrémité C-terminale peuvent être des domaines d'activation ou de répression de la transcription (Jin et Martin, 1999). Selon cette classification, TT2 appartient au sous-groupe 5 avec le facteur MYB de maïs C1, et il serait néanmoins très proche du sous-groupe 6 comportant PAP1, PAP2, AtMYB113 et AtMYB114 (Figure 16 ; Dubos *et al.*, 2010 ; Stracke *et al.*, 2001).

Une autre spécificité de la famille des MYB végétaux est la présence de nombreux facteurs à une seule répétition MYB (Tableau 3). Certains de ces facteurs sont capables de réguler l'expression des gènes par liaison directe à l'ADN alors que d'autres agiraient par des mécanismes d'interaction protéine-protéine.

4.2.3 Propriétés générales des facteurs de transcription de type bHLH

A l'origine, le domaine bHLH a été caractérisé dans des protéines animales qui régulent la prolifération et la différenciation cellulaires (protéines MYC). Chez *A. thaliana*, ce motif de liaison à l'ADN est présent chez 162 facteurs de transcription potentiels (Bailey *et al.*, 2003), ce qui est comparable au nombre de bHLH identifiées chez l'homme et la souris (125 et 102, respectivement ; Heim *et al.*, 2003). Les fonctions des bHLH végétales sont variées et leur implication a été mise en évidence dans la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes, dans la voie de signalisation des phytochromes et dans le développement de l'épiderme et des carpelles (Tableau 4).

Le domaine bHLH est composé d'une région de 18 aa basiques et hydrophiles, suivie de deux régions aux aa hydrophobes, formant des hélices α amphipolaires et séparées par une boucle de longueur variable (Heim *et al.*, 2003). Chez les protéines d'origine animale, le domaine basique se lie à la séquence consensus d'ADN CANNTG, aussi appelé motif E-box. Les aa impliqués dans cette interaction sont conservés chez une majorité de facteurs bHLH d'origine végétale. D'ailleurs certains de ces facteurs reconnaissent de manière spécifique un type particulier d'E-box, la G-box de séquence CACGTG (Kawagoe et Murai, 1996 ; de Pater *et al.*, 1997). Certains aa formant les hélices α sont impliqués dans la formation de dimères et ils sont conservés dans la plupart des bHLH d'origine végétale (Heim *et al.*, 2003).

Gène	Locus ID	AtbHLH	Processus régulé	Référence
ALC	At5g67110	AtbHLH073	Déhiscence de la silique	Rajani et Sundaresan (2001)
AMS	At2g16910	AtbHLH021	Développement de la microspore	Sorensen <i>et al.</i> (2003)
MYC2	At1g32640	AtbHLH006	Régulation de l'expression des gènes par l'ABA	Abe <i>et al.</i> (2003)
ATR2	At5g46760	AtbHLH005	Régulation du métabolisme du tryptophane	Smolen <i>et al.</i> (2002)
BEE1	At1g18400	AtbHLH044	Voie de signalisation des brassinostéroïdes	Friedrichsen <i>et al.</i> (2002)
BEE2	At4g36540	AtbHLH058	Voie de signalisation des brassinostéroïdes	Friedrichsen <i>et al.</i> (2002)
BEE3	At1g73830	AtbHLH050	Voie de signalisation des brassinostéroïdes	Friedrichsen <i>et al.</i> (2002)
EGL3	At1g63650	AtbHLH002	Développement des trichomes, Espacement des poils racinaires, Métabolisme des anthocyanes	Zhang <i>et al.</i> (2003)
GL3	At5g41315	AtbHLH001	Développement des trichomes, Espacement des poils racinaires	Payne <i>et al.</i> (2000)
HFR1	At1g02340	AtbHLH026	Voie de signalisation des phytochromes	Fairchild <i>et al.</i> (2000)
ICE1	At3g26744	AtbHLH116	Résistance au froid et au gel	Chinnusamy <i>et al.</i> (2003)
IND	At4g00120	AtbHLH040	Déhiscence de la silique	Liljegren <i>et al.</i> (2004)
ORG2	At3g56970	AtbHLH038	Voie de signalisation de l'acide salicylique	Kang <i>et al.</i> (2003)
ORG3	At3g56980	AtbHLH039	Voie de signalisation de l'acide salicylique	Kang <i>et al.</i> (2003)
PIF3	At1g09530	AtbHLH008	Voie de signalisation des phytochromes	Ni <i>et al.</i> (1998)
PIF4	At2g43010	AtbHLH009	Voie de signalisation des phytochromes	Huq et Quail (2002)
PIL1	At2g46970	AtbHLH124	Voie de signalisation des phytochromes	Yamashino <i>et al.</i> (2003)
PIL2	At3g62090	AtbHLH132	Voie de signalisation des phytochromes	Yamashino <i>et al.</i> (2003)
PIL5	At2g20180	AtbHLH015	Voie de signalisation des phytochromes	Yamashino <i>et al.</i> (2003)
PIL6	At3g59060	AtbHLH065	Voie de signalisation des phytochromes	Yamashino <i>et al.</i> (2003)
SPT	At4g36930	AtbHLH024	Développement style et stigmates	Heisler <i>et al.</i> (2001)
TT8	At4g09820	AtbHLH042	Métabolisme des PA	Nesi <i>et al.</i> (2000)

Tableau 4 : Protéines à domaine bHLH caractérisées fonctionnellement chez *A. thaliana* (d'après Toledo-Ortiz *et al.*, 2003)

ALC, alcatraz ; AMS, aborted microspores ; ATR, altered tryptophane regulation ; BEE, BR enhanced expression ; EGL3, enhancer of glabra3 ; GL3, glabra3 ; HFR1, long hypocotyl in far-red light1 ; ICE1, inducer of CBF expression1 ; IND, indehiscent ; ORG, OBP3-responsive gene ; PIF, phytochrome interacting factor ; PIL, PIF3-like ; SPT, spatula ; TT8, transparent testa8.

Une classification des bHLH d'*A. thaliana* a été effectuée en prenant en compte le nombre et la position des introns, la position du domaine bHLH dans la protéine et la présence d'aa conservés en dehors du domaine bHLH (Heim *et al.*, 2003). Douze sous-familles ont été obtenues, parmi lesquelles, la sous-famille IIIf comprend TT8, AtMYC1, GL3 et EGL3.

4.3 LES FACTEURS MYB ET BHLH REGULANT LA BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES

4.3.1 Généralités

Chez la majorité des espèces végétales pour lesquelles la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes a été étudiée par des méthodes de biologie moléculaire, un rôle majeur des protéines à domaine MYB et bHLH a été mis en évidence pour l'activation directe des gènes codant pour les enzymes de biosynthèse (Irani *et al.*, 2003 ; Davies et Schwinn, 2003). Historiquement, les premiers régulateurs isolés furent C1 (MYB) et R (bHLH) impliqués dans la biosynthèse des anthocyanes chez le maïs (Paz-Ares *et al.*, 1987 ; Dellaporta *et al.*, 1988). De nombreux gènes, homologues à C1 et R, ont ensuite été isolés dans les autres espèces végétales, ainsi que des gènes appartenant à d'autres familles de régulateurs comme par exemple les protéines à répétitions WD (protéines WDR) et des facteurs de type bZIP ou homéobox (Tableau 5). L'analyse de ces différents régulateurs a tout d'abord révélé une conservation fonctionnelle, notamment dans les interactions entre les facteurs MYB et bHLH pour l'activation de leurs cibles. Mais également des différences importantes ont été mises en évidence pour la régulation des enzymes précoces et des enzymes tardives de la voie ou pour les mécanismes de régulation de ces régulateurs.

	MYB	bHLH	WDR	Autres facteurs
Biosynthèse des anthocyanes				
<i>Zea mays</i> (maïs)	C1, PL	R, B, Sn, Lc IN1*	PAC1	
<i>A. thaliana</i>	PAP1, PAP2	EGL3, TT8, GL3	TTG1	ANL2 (Homeobox) TTG2 (WRKY)
<i>Petunia hybrida</i> (pétunia)	AN2, AN4	JAF13, AN1	AN11	
<i>Antirrhinum majus</i> (muflier)	ROSEA 1/2, VENOSA	DELILA, MUTABILIS		
<i>Perilla frutescens</i>	MYB-P1	MYC-RP/GP	PFWD	
<i>Gerbera hybrida</i> (gerbera)	GMYP10	GMYP1		
<i>Pisum sativum</i> (pois)		A, A2		
<i>Fragaria x ananase</i> (fraisier)	FaMYB1*			
<i>Oryza sativa</i> (riz)		OSB1, OSB2		
<i>Petroselinum crispum</i> (persil)				CPRF1*, CPRF2, CPRF5-7 (facteurs bZIP)
<i>Vitis vinifera</i> (vigne)	MYBA			
<i>Lycopersicon sp.</i> (tomate)	ANT1			
Biosynthèse des PA				
<i>A. thaliana</i>	TT2	TT8	TTG1	TTG2 (WRKY) TT1 (WIP Zn finger) TT16 (MADS-box)
<i>Hordeum vulgare</i> (orge)		ANT13		
Biosynthèse des phlobaphènes				
<i>Zea mays</i>	P			
<i>Sorghum bicolor</i> (sorgho)	Y			

Tableau 5 : Régulateurs de la biosynthèse des flavonoïdes chez les plantes (d'après Irani *et al.*, 2003 ; Davies et Schwinn, 2003 ; Mathews *et al.*, 2003)

AN ou ANT, anthocyanin ; ANL2, anthocyaninless2 ; B, booster ; C1, colorless1 ; CPRF, common plant regulatory factor ; EGL3, enhancer of glabra3 ; GL3, glabra3 ; IN1, intensifier1 ; Lc, leaf color ; MYC-GP, MYC green perilla ; MYC-RP, MYC red perilla ; OSB, *Oryza sativa* homologue of *B-peru* ; P, pericarp color ; PAC1, pale aleurone color1 ; PAP, production of anthocyanin pigment ; PFWD, *Perilla frutescens* WDR ; PL, purple leaf ; R, red plant color ; Sn, scutellar node color ; TT, transparent testa ; TTG, transparent testa glabra. (*) Régulateurs négatifs.

4.3.2 L'interaction MYB-bHLH : exemple des facteurs C1 et R de maïs

Généralités

La régulation de la biosynthèse des flavonoïdes a été étudiée de façon très approfondie chez le maïs. Différents travaux ont permis de révéler le rôle prépondérant joué par les membres de deux familles de facteurs de transcription, les gènes homologues des facteurs C1 (MYB) et R (bHLH) qui régulent la production des anthocyanes dans les différents organes pigmentés du maïs (Tableau 5). Une interaction directe entre les membres de ces deux familles de gènes est nécessaire pour l'activation spécifique de l'ensemble de la voie de biosynthèse des anthocyanes (Goff *et al.*, 1992). Cependant, pour la production d'autres composés flavonoïques, des polymères appartenant à la classe des phlobaphènes, un seul type de régulateur est suffisant pour activer l'ensemble des gènes nécessaires à la biosynthèse de ces composés : la protéine P appartenant à la famille des facteurs de type MYB (Grotewold *et*

al., 1994). Ainsi, pour l'activation des mêmes gènes (*CHS/C2*, *CHI* et *DFR/A1*), C1 nécessite une interaction avec R alors que P ne semble pas avoir besoin d'un autre partenaire protéique.

Analyse fonctionnelle de C1 et B

L'interaction entre C1 et B (l'un des nombreux homologues de R ; Radicella *et al.*, 1991) a été étudiée par des expériences de double-hybride réalisées dans la levure et *in planta* (Goff *et al.*, 1991 et 1992). Cette interaction a lieu entre la région N-terminale de B (aa 1 à 244) et le domaine MYB de C1, indépendamment de la liaison aux promoteurs. Un domaine d'activation de la transcription de force comparable à celle de VP16 ou de GAL4 a été identifié dans la partie C-terminale de C1 (domaine d'activation fort), une région présentant des aa acides (aa 234 à 273). Par contre, aucun domaine d'activation de la transcription n'a pu être mis en évidence dans B qui serait ainsi dépendant de son interaction avec C1 pour remplir cette fonction d'activation de la transcription. D'autre part, l'interaction entre C1 et B n'a pas d'influence sur la capacité d'activation de la transcription de C1 et si ce domaine est remplacé par VP16, C1 reste dépendant de B pour l'activation de leurs cibles *in planta*. L'interaction entre C1 et B n'a donc pas pour effet d'induire l'activité du domaine d'activation présent dans C1 (Goff *et al.*, 1991).

L'hypothèse privilégiée est que cette interaction permette de potentialiser la liaison à l'ADN du domaine MYB et du domaine bHLH. En effet, si le domaine bHLH (présent à l'extrémité C-terminale) est supprimé, la protéine B résultante, qui conserve son domaine d'interaction avec C1, reste capable d'activer ses cibles *in planta*. Cette délétion entraîne seulement une diminution de 50 % du niveau d'expression d'un gène rapporteur formé par la fusion transcriptionnelle entre le promoteur de *Bz1* (gène codant pour une UDP glucose-flavonol-3-O-glucosyltransférase spécifique de la biosynthèse des anthocyanes) et la luciférase. De la même façon, une mutation ponctuelle dans le domaine MYB de C1 permet d'inhiber sa capacité de liaison à l'ADN (remplacement de D en position 101 par E) sans affecter son interaction avec B. La protéine résultante reste capable d'activer la transcription d'un gène rapporteur (fusion transcriptionnelle entre le promoteur de *DFR/A1* et la luciférase) à un niveau équivalent à 11 % de l'activation conférée par C1/B (Sainz *et al.*, 1997). En comparaison, aucune activation significative de ces gènes rapporteurs n'a pu être mise en évidence dans les mêmes expériences d'activation transitoire par la simple transformation par C1 ou B.

Etude comparative de P et C1

La preuve de l'interaction directe entre les régulateurs P et C1 et les promoteurs des gènes codant pour les enzymes de biosynthèse des flavonoïdes a été apportée par la réalisation d'expériences de retard de migration sur gel (Grotewold *et al.*, 1994 ; Sainz *et al.*, 1997 ; Lesnick et Chandler, 1998). Tout d'abord, des expériences menées avec le promoteur de *DFR/Al* et la protéine P produite chez *E. coli* ont permis de mettre en évidence une interaction directe entre ce promoteur et le domaine MYB de P (Grotewold *et al.*, 1994). L'identification précise des régions cis-régulatrices impliquées dans cette interaction a révélé que ces sites sont impliqués dans l'activation *in planta* par C1/B, montrant que P et C1 sont capables de reconnaître les mêmes séquences régulatrices dans ce promoteur. Ces séquences régulatrices sont composées de deux sites de fixation, un site proximal (région -65 à -55 par rapport au site d'initiation de la transcription) de séquence ACCTACCAACC présentant les deux sites imbriqués CCTACC et CCAACC, et un site distal (région -116 à -124, orientation inversée) de séquence AACTACCGG. La réalisation d'expériences de retard de migration sur gel avec la protéine C1 produite chez *E. coli* a permis de confirmer que C1 est capable, comme P, de se fixer à ces deux sites *in vitro* (Sainz *et al.*, 1997), et ceci indépendamment de l'addition de B dans le milieu réactionnel. Par contre, l'analyse des affinités de liaison entre C1, P et le site de fixation proximal a permis de mettre en évidence une différence d'affinité. Les constantes d'affinité mesurées pour ce site de fixation sont de 52 nM pour P et de 330 nM pour C1 révélant une affinité 6 fois plus importante pour P. La détermination des séquences consensus reconnues par les domaines MYB de C1 et de P lors d'expériences de « PCR site selection » a également permis de mettre en évidence quelques différences entre ces protéines. En accord avec la séquence des sites de fixation déterminée dans le promoteur de *DFR/Al*, la séquence consensus est CCWACC pour P et AMCWAMC pour C1 (Grotewold *et al.*, 1994 ; Sainz *et al.*, 1997). Cette différence d'affinité des sites MYB de C1 et P permet d'expliquer en partie pourquoi C1 pourrait avoir besoin de B pour potentialiser son interaction avec l'ADN. Cependant, la réalisation d'expériences de retard sur gel avec C1 sans que la présence de B ne soit nécessaire suggère que B n'est peut-être pas indispensable pour la liaison à l'ADN de C1. Malgré tout, dans tous les tests de transactivation de promoteurs effectués *in planta*, C1 reste dépendant de B pour induire une activation significative (Sainz *et al.*, 1997). C'est pourquoi plusieurs hypothèses ont été avancées pour essayer d'expliquer les contradictions révélées entre les expériences réalisées *in vitro* et *in planta*. Notamment, il a été proposé que l'interaction avec B puisse avoir une influence sur l'activité de C1 en renforçant l'efficacité de sa translocation dans le noyau ou en le stabilisant.

Le rôle de la bHLH (B/R) est de réguler la spécificité de liaison à l'ADN du MYB

Des résultats récents permettent cependant d'affirmer que le rôle de B est principalement de moduler la spécificité du domaine MYB de C1 (Grotewold *et al.*, 2000). Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier les aa du domaine MYB de C1 qui sont responsables de l'interaction avec R, ce sont les aa L77, R80, R83 et L84 qui sont tous présents dans le domaine R3 de C1. Ces aa sont également retrouvés dans la séquence du domaine R3 de plusieurs MYB d'*A. thaliana* : TT2, GL1, PAP1 et PAP2. Leur mutation dans la protéine C1 rend l'interaction avec B impossible. Par contre, le remplacement des aa correspondants dans la séquence de P (P^{I77L,K80R,A83R,T84L}) permet l'interaction entre P et B. Par la modification de deux aa supplémentaires (S94G et H95R) la protéine P devient capable d'activer *in planta* la transcription de *Bz1*, une cible habituelle de C1/B mais pas de P, et ceci seulement en présence de B. Mais cette dernière protéine P^{I77L,K80R,A83R,T84L,S94G,H95R} conserve également certaines caractéristiques de P puisqu'elle reste capable d'activer *DFR/A1* indépendamment de B. Ainsi, le changement de quelques aa a permis de conférer de nouvelles propriétés au domaine MYB de P sans altérer son activité de liaison au promoteur de *DFR/A1*. Autrement dit, même en l'absence de B la protéine MYB chimérique est active, le rôle de B serait donc principalement d'agir sur la spécificité de liaison à l'ADN du MYB.

4.3.3 Différences interspécifiques dans la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes

La régulation des enzymes précoces et des enzymes tardives de la voie de biosynthèse

L'étude de la cinétique d'expression des gènes de biosynthèse a révélé des différences suivant les espèces étudiées (pour revue Mol *et al.*, 1998). Ainsi, chez le maïs, l'ensemble des gènes de biosynthèse est activé de façon coordonnée par C1/R ou leurs homologues dans les tissus qui accumulent des anthocyanes. Par contre, chez les Dicotylédones, deux catégories de gènes peuvent être distinguées, les gènes intervenant précocement ou tardivement dans la voie de biosynthèse. Cependant, cette distinction varie selon les espèces et elle peut être corrélée aux types de composés accumulés. Par exemple, chez le mufler qui produit principalement des flavanones et des anthocyanes, la classe des gènes tardifs inclut les gènes codant pour la F3H et les enzymes qui la suivent dans la voie (Martin *et al.*, 1991), alors que chez le pétunia et chez *A. thaliana*, accumulant des flavonols, des anthocyanes et des PA, la classe des gènes

tardifs débute au niveau de la DFR (Kubasek *et al.*, 1992 ; Quattrocchio *et al.*, 1993 ; Quattrocchio *et al.*, 1998 ; Nesi *et al.*, 2000).

Ces différences pourraient indiquer chez certaines espèces, l'existence de mécanismes redondants pour la régulation de l'expression des gènes intervenant précocement dans la voie. Mais au lieu de cela, des résultats suggèrent la présence de deux groupes de régulateurs (Quattrocchio *et al.*, 1993 ; Quattrocchio *et al.*, 1998). En effet, dans des expériences d'expression transitoire les régulateurs de pétunia AN2 (MYB) et JAF13 (bHLH) impliqués dans la régulation de la DFR de pétunia (DFRA) sont capables d'activer un gène codant pour la CHS de maïs (*C2*), comme *C1/R*, mais pas un gène codant pour la CHS de pétunia (*CHSA*). Ainsi, un premier groupe de régulateurs chez le pétunia comprendrait AN2 et JAF13, les orthologues putatifs de *C1/R*, et serait capable d'activer la transcription des gènes spécifiques de la biosynthèse des anthocyanes, alors qu'un second groupe de régulateurs contrôlerait l'expression des gènes intervenant plus précocement dans la voie. Les membres de ce dernier groupe de régulateurs n'ont pas encore été identifiés. Ces résultats indiquent également une conservation fonctionnelle entre *C1/R* et AN2/JAF13 et suggèrent que les différences observées lors de l'introduction de ces gènes dans différentes espèces végétales sont principalement liées à une divergence dans les séquences cis-régulatrices des gènes de structure (Quattrocchio *et al.*, 1993 ; Quattrocchio *et al.*, 1998).

Différences dans le contrôle de l'expression des régulateurs

Les données concernant la régulation de l'expression des régulateurs de la biosynthèse des flavonoïdes sont peu nombreuses. Les quelques résultats obtenus suggèrent l'existence de différences interspécifiques. Il a été montré par exemple que l'expression de *C1* dans le grain de maïs est sous la dépendance directe du facteur VIVIPAROUS1 (*VP1*) et de l'ABA (Hattori *et al.*, 1992 ; Suzuki *et al.*, 1997). Par contre, la biosynthèse des flavonoïdes ne semble pas affectée dans les graines du mutant *abi3* d'*A. thaliana* (*ABI3* code pour l'orthologue de *VP1* ; Percy *et al.*, 1994 ; Suzuki *et al.*, 2001). En ce qui concerne les facteurs de type bHLH, un contrôle par les autres régulateurs de la biosynthèse des flavonoïdes a été mis en évidence chez le pétunia et chez *A. thaliana*. Les facteurs MYB AN2 et AN4 sont capables d'activer l'expression de AN1 (bHLH), leur partenaire pour l'activation de la biosynthèse des anthocyanes chez le pétunia (Spelt *et al.*, 2000). L'expression de *TT8* est contrôlée par *TTG1* dans les graines d'*A. thaliana* et peut être induite de façon ectopique par *TT2 in planta* (Nesi

et al., 2000 et 2001). Par contre, ce type de contrôle complexe n'a pas été mis en évidence chez le maïs (*Carey et al.*, 2004).

Différences fonctionnelles entre les régulateurs

Certaines expériences d'expression en système hétérologue ont également révélé des différences fondamentales dans la fonctionnalité des régulateurs. Par exemple, plusieurs membres de la famille des bHLH ont été surexprimés chez le tabac (*Nicotiana tabacum*), le pétunia et chez *A. thaliana*. Quand Lc ou R (deux bHLH de maïs ; Tableau 5) ont été utilisés, une augmentation significative de la production des anthocyanes a été observée, mais sans entraîner d'accumulation ectopique (Lloyd *et al.*, 1992 ; Bradley *et al.*, 1998). Tout d'abord, ce résultat indique que chez ces plantes, l'homologue de Lc/R est probablement limitant dans la plupart des tissus, alors que l'homologue de C1 serait présent en quantité suffisante pour interagir avec Lc/R et permettre une augmentation de la pigmentation. De même, la surexpression de DELILA (bHLH de mufler ; Tableau 5) a provoqué une augmentation de la pigmentation chez le tabac, par contre, elle n'a eu aucun effet chez *A. thaliana* (Mooney *et al.*, 1995). Afin d'expliquer ces résultats, il a été proposé que DELILA et Lc aient des spécificités de liaison à l'ADN différentes et/ou que DELILA soit plus sensible à un système de régulation négatif auquel pourraient échapper Lc et R. En accord avec cette dernière hypothèse, une complémentation du phénotype de *ttg1* a été obtenue chez *A. thaliana* par la surexpression de R (Lloyd *et al.*, 1992). TTG1 ne code pas pour un facteur de type bHLH mais pour une protéine à domaine WDR qui pourrait être nécessaire à l'activité de certaines bHLH (Walker *et al.*, 1999). Il est probable que R/Lc puissent se passer de la fonction associée à TTG1, contrairement aux bHLH d'*A. thaliana*.

5 DONNEES FONCTIONNELLES SUR LES PROTEINES A DOMAINE WDR HOMOLOGUES DE TTG1

5.1 GENERALITES SUR LES PROTEINES A DOMAINE WDR

Le domaine WDR est retrouvé dans de nombreuses protéines pouvant intervenir dans des processus cellulaires très variés, comme par exemple la transduction de signaux, la dynamique du cytosquelette, la régulation de la localisation sub-cellulaire des protéines, la production des ARNm, la modification de la structure de la chromatine ou les mécanismes de régulation de la transcription (Van Nocker et Ludwig, 2003). Dans ces différents processus, le domaine WDR est impliqué dans des interactions protéine-protéine et il peut servir de façon stable ou transitoire à l'assemblage de complexes protéiques. Dans certaines protéines, son association à d'autres domaines fonctionnels permet de promouvoir une interaction entre plusieurs protéines. Par exemple, le domaine WDR est présent dans de nombreuses protéines à activité E3-ubiquitin ligase où il est responsable de la spécificité de la reconnaissance de la protéine à dégrader (Smalle et Vierstra, 2004). Ainsi dans la protéine COP1 le domaine WDR est juxtaposé à un domaine de type « Ring-finger », ce qui permet d'interagir spécifiquement avec certains facteurs de transcription (HY5, HYH et LAF1) et d'induire leur dégradation par le protéasome 26S (Seo *et al.*, 2003).

Le motif WDR se caractérise par une séquence peu conservée d'environ 40 aa se terminant par les deux aa W et D, c'est pourquoi il est aussi appelé domaine WD40. Il est notamment présent dans la sous-unité G β des GTPases hétérotrimériques à laquelle il confère une structure tridimensionnelle particulière par formation de feuillets β antiparallèles qui s'organisent en une structure cylindrique appelée hélice β (Walker *et al.*, 1999).

Dans le génome d'*A. thaliana*, 237 gènes putatifs codant pour des protéines présentant 4 à 10 répétitions du domaine WDR ont été isolées (Van Nocker et Ludwig, 2003). Celles dont la caractérisation fonctionnelle est la plus avancée sont COP1 qui régule la photomorphogénèse (Hardtke et Deng, 2000), LEUNIG qui est impliquée dans un complexe répresseur de l'expression d'*AGAMOUS* (Conner et Liu, 2000) et PRL1 qui intervient dans la réponse à de nombreux stimuli : le glucose, le saccharose, le froid et les phytohormones (Nemeth *et al.*, 1998).

5.2 LES HOMOLOGUES DE TTG1

5.2.1 Analyse phylogénétique des gènes homologues de *TTG1*

De nombreux gènes homologues de *TTG1* sont connus chez les végétaux mais aussi chez d'autres eucaryotes (de Vetten *et al.*, 1997 ; Carey *et al.*, 2004). L'homologie de séquence est très forte entre ces différents gènes, probablement à cause de la pression de sélection imposée par la structure tridimensionnelle caractéristique de la protéine pour laquelle ils codent, en hélice β . Une analyse phylogénétique a permis de classer ces gènes en fonction de leur séquence (Carey *et al.*, 2004). Deux groupes ressortent de cette classification suivant l'homologie de séquence avec les gènes de maïs *PAC1* ou *MPI*. Le groupe défini par *PAC1* comprend tous les gènes impliqués dans la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes c'est-à-dire *TTG1* (Walker *et al.*, 1999), le gène *AN11* de pétunia (de Vetten *et al.*, 1997), le gène *PFWD* de *Perilla frutescens* (Sompornpailin *et al.*, 2002) et le gène *PAC1* de maïs (Carey *et al.*, 2004). Le second groupe, défini par le gène *MPI* de maïs, ne comprend pas de gènes dont la fonction est connue. On y retrouve les gènes les plus proches de *TTG1* présents chez *A. thaliana*, *AtAN11A* et *AtAN11B* (de Vetten *et al.*, 1997).

Les différents résultats de comparaison fonctionnelle entre ces gènes homologues sont en accord avec la classification phylogénétique. Ainsi l'expression ectopique de *AN11*, *PFWD* ou *PAC1* permet la complémentation du phénotype du mutant *ttg1* d'*A. thaliana* (Payne *et al.*, 2000 ; Sompornpailin *et al.*, 2002 ; Carey *et al.*, 2004). Chez certains transformants, une surproduction des trichomes, des anthocyanes et des poils racinaires a même été observée (Sompornpailin *et al.*, 2002). Par contre, lors de tests d'activation transitoire d'un gène rapporteur composé du promoteur de la *DFR* de pétunia et de la séquence codante de la luciférase, *AtAN11A*, *AtAN11B* et l'homologue humain (*HsAN11*) provoquent une activation faible correspondant à 10 % de celle conférée par *AN11*, et l'homologue de levure (*ScAN11*) ne montre aucune activité (de Vetten *et al.*, 1997). Ces résultats suggèrent une différence d'activité entre les protéines codées par les gènes du groupe de *PAC1* et les autres membres de la famille.

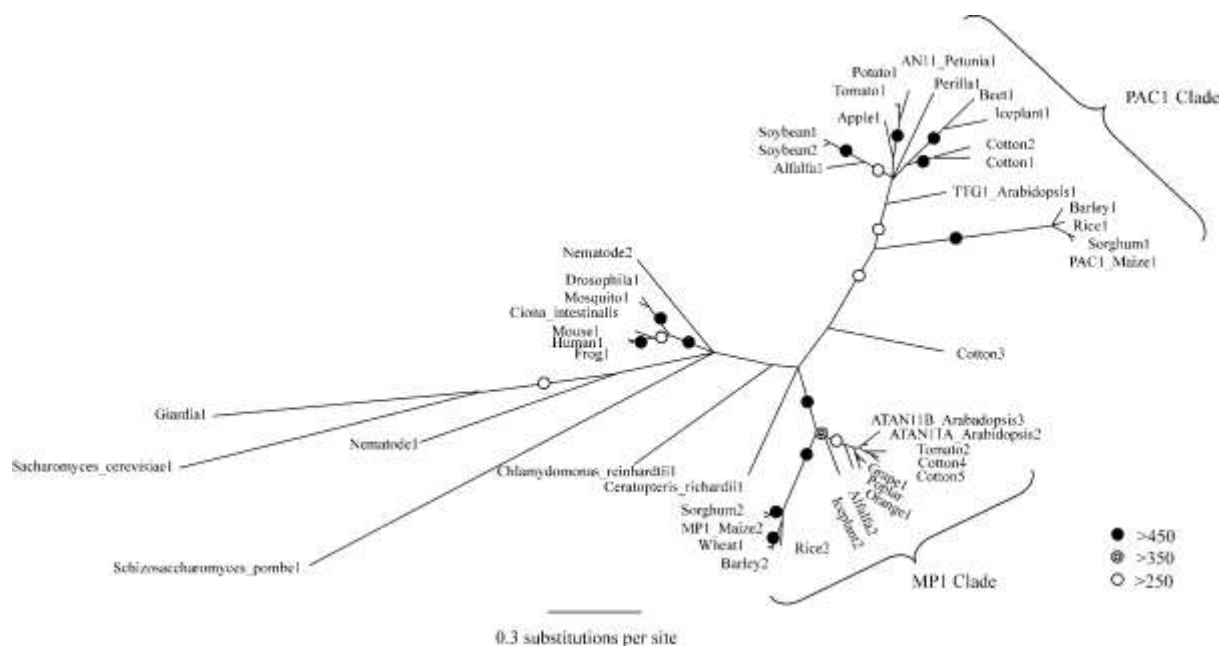


Figure 17 : Analyse phylogénétique des homologues de TTG1 (Carey *et al.*, 2004)

Trois clades principaux ressortent de l'analyse phylogénétique des homologues de TTG1. Le clade de PAC1 comprend PAC1, AN11 et TTG1. Le clade de MP1 comprend MP1, ATAN11A et ATAN11B. Un troisième clade regroupe les homologues qui ne sont pas issus du monde végétal. Cet arbre phylogénétique a été obtenu par une analyse de matrices de distance (« neighbour joining »). Un nombre total de 500 arbres a été obtenu, le nombre d'arbres ayant servi à définir chaque embranchement est indiqué dans la légende, à l'exception des embranchements retrouvés dans un nombre d'arbres inférieur à 250. La distance représentée par la barre correspond à un nombre de substitution de 0.3 aa par site. Pour plus de précisions sur la méthode employée pour l'analyse phylogénétique, se reporter à Carey *et al.*, 2004.

5.2.2 Localisation sub-cellulaire des protéines homologues de TTG1

L'étude de la localisation sub-cellulaire de la protéine AN11 a été effectuée par fractionnement des composants de cellules de fleurs de pétunia (de Vetten *et al.*, 1997). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre AN11 a permis de révéler la présence de cette protéine dans la fraction correspondant aux composants cytoplasmiques. Cette localisation principalement cytoplasmique a été confirmée pour les protéines TTG1 et PFWD par la réalisation de fusions traductionnelles avec la protéine GUS (Walker *et al.*, 1999 ; Sompornpailin *et al.*, 2002). Cependant, dans le cas de PFWD, un changement de localisation a été observé lors de la co-transformation avec la bHLH de *Perilla frutescens*, MYC-RP, induisant une translocation vers le noyau (Sompornpailin *et al.*, 2002). Ce dernier résultat suggère que les protéines du groupe de PAC1 ont une localisation principalement cytoplasmique mais qu'elles pourraient agir dans le noyau après transfert par interaction avec une protéine bHLH.

5.2.3 Interactions de TTG1 et de ses homologues avec les facteurs MYB et bHLH

En accord avec les résultats de localisation sub-cellulaire, des interactions entre les protéines du groupe de PAC1 et des protéines à domaine bHLH ont été mises en évidence par des méthodes de double-hybride chez la levure. Ainsi, des interactions ont été décrites entre TTG1 et les protéines EGL3 et GL3 (Payne *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2003), entre PFWD et MYC-RP (Sompornpailin *et al.*, 2002), et entre AN11, AN1 et JAF13 (Kroon, 2004). En plus de cette interaction directe, TTG1 régulerait l'expression de certaines bHLH comme *TT8* chez *A. thaliana*. Mais cette propriété ne semble pas partagée par tous ses homologues des autres espèces (Nesi *et al.*, 2000 ; Carey *et al.*, 2004). Par contre, des résultats plus complexes ont été obtenus au niveau génétique. En effet, le facteur AN2 (MYB) de pétunia est capable de compléter l'absence d'anthocyanes dans le mutant *an11* (de Vetten *et al.*, 1997), alors que la complémentation de *ttg1* a été obtenue par surexpression des facteurs bHLH : R, GL3 ou EGL3 (Lloyd *et al.*, 1992 ; Payne *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2003). Ces derniers résultats nous indiquent que TTG1 et ses homologues pourraient être impliqués dans la régulation de l'activité des facteurs de transcription (MYB et/ou bHLH) contrôlant la biosynthèse des flavonoïdes.

5.3 LES VOIES DE REGULATION DEPENDANTES DE TTG1 CHEZ A. THALIANA

5.3.1 Généralités

TTG1 est impliqué dans différents mécanismes de régulation chez *A. thaliana* sans lien évident : la régulation du métabolisme des flavonoïdes et des mucilages, l'induction de la production des trichomes et l'inhibition de la formation des poils racinaires (Koorneef, 1981). Cependant, l'existence de mécanismes communs de régulation pour la production de métabolites secondaires et l'induction des trichomes pourrait s'expliquer par le fait que, chez certaines espèces végétales, les trichomes accumulent spécifiquement des métabolites secondaires toxiques pouvant entrer dans la lutte contre les herbivores. Chez le pétunia, la protéine AN11 a également des rôles multiples, puisqu'en plus de la régulation de la biosynthèse des anthocyanes et des PA, elle contrôle la morphologie des cellules des téguments de la graine et le pH des cellules composant les pétales (Carey *et al.*, 2004). Dans

chacune des voies contrôlées par TTG1, des facteurs MYB et bHLH ont été identifiés, ce qui suggère l'existence d'un module de régulation commun (Tableau 6). D'ailleurs, certains résultats suggèrent une très forte homologie fonctionnelle au sein de ces classes particulières de facteurs MYB ou bHLH, comme cela est illustré dans les paragraphes qui suivent.

	Production des poils racinaires	Induction des trichomes	Métabolisme des flavonoïdes	Synthèse des mucilages
MYB	WER	GL1, AtMYB23	TT2, PAP1/2	AtMYB61
bHLH	GL3, EGL3	GL3, EGL3	TT8, EGL3	TT8, EGL3
WDR	—————		TTG1	—————

Tableau 6 : Facteurs MYB et bHLH identifiés dans les voies contrôlées par TTG1

EGL3, enhancer of glabra3 ; GL, glabra ; PAP, production of anthocyanin pigment ; TT, transparent testa ; TTG, transparent testa glabra ; WER, werewolf.

5.3.2 Homologie fonctionnelle entre GL1 et WER

GL1 et WER sont deux facteurs MYB impliqués respectivement dans l'induction de la production des trichomes et dans l'inhibition de la formation des poils racinaires (Oppenheimer *et al.*, 1991 ; Lee et Schiefelbein, 1999). Dans la classification des MYB d'*A. thaliana*, ils constituent le sous-groupe 15 (Dubos *et al.*, 2010 ; Stracke *et al.*, 2001), dont est membre un troisième facteur, AtMYB23 (Kirik *et al.*, 2001). L'homologie de séquence entre les protéines GL1 et WER est de 57 % d'identité en aa, avec 91 % d'identité dans la région couverte par le domaine MYB. Afin de tester l'homologie fonctionnelle entre GL1 et WER, la séquence codante de WER a été placée sous le contrôle des régions promotrices de *GL1* et ce construit a été introduit dans le mutant *gll* (Lee et Schiefelbein, 2001). L'expérience inverse a aussi été effectuée, avec la transformation de *wer* par un construit plaçant la séquence codante de GL1 sous le contrôle des régions régulatrices de l'expression de *WER*. Dans les deux expériences, une restauration du phénotype sauvage a été observée pour chaque mutant, indiquant que GL1 et WER sont des protéines fonctionnellement homologues, leur rôle dans la production des trichomes ou des poils racinaires dépendant uniquement de leur profil d'expression. De ce fait, elles ne sont pas directement responsables de la détermination de l'identité cellulaire des trichomes ou des poils racinaires. En effet, dans ces deux voies, l'activité de WER et de GL1 dépend de l'activation du même gène, GL2, qui appartient à la classe des facteurs de transcription de type homéobox (Lee et Schiefelbein, 2001).

5.3.3 Mécanisme de redondance partielle entre les facteurs bHLH dépendants de TTG1

L'homologie fonctionnelle entre les différents facteurs à domaine bHLH impliqués dans les voies dépendantes de TTG1 a été suggérée précocement par le fait que l'ensemble de ces voies peut être activé par l'expression ectopique de R, le facteur bHLH de maïs (Lloyd *et al.*, 1992). *EGL3* a été cloné par la réalisation d'une mutagenèse du mutant nul *gl3*. Celui-ci produit encore quelques trichomes et les doubles mutants ont été sélectionnés afin d'obtenir des plantes complètement glâbres (double mutant *gl3 x egl3*). Le phénotype des plantes ayant simplement la mutation *egl3* a été mis en évidence par une étude précise de chaque voie régulée par TTG1. Cette étude a révélée une réduction du nombre des trichomes et une réduction de l'accumulation des anthocyanes et des mucilages suggérant que EGL3 peut participer à plusieurs voies régulées par TTG1 (Zhang *et al.*, 2003). Afin de préciser la contribution de chacune de ces bHLH *in planta*, la caractérisation des doubles mutants *egl3 x tt8* et *gl3 x tt8*, et du triple mutant *gl3 x egl3 x tt8* a été entreprise. Les résultats confirment le rôle de GL3 et d'EGL3 dans l'induction des trichomes et indiquent que la régulation de la production des mucilages de la graine est contrôlée par TT8 et EGL3 (Zhang *et al.*, 2003). EGL3, TT8 et dans une moindre mesure GL3 participeraient à la régulation de la production des anthocyanes dans les plantules (Zhang *et al.*, 2003) et la production des poils racinaires serait principalement régulée par GL3 et EGL3 (Bernhardt *et al.*, 2003). Par contre, aucun effet de EGL3 ou de GL3 n'a été révélé pour la régulation de la production des PA. Cette absence de redondance pourrait être liée à une absence d'expression de GL3 ou d'EGL3 dans l'endothélium. Cependant l'expression ectopique de *GL3* dans le mutant *tt8* induit très faiblement la production des PA contrairement à l'expression ectopique de *TT8* ou d'*EGL3* qui sont plus efficaces pour restaurer ce phénotype. Ce dernier résultat suggère une certaine différence dans l'activité des protéines TT8, GL3 et EGL3 malgré leur implication dans un mécanisme de régulation partiellement redondant et leur homologie de séquence (Zhang *et al.*, 2003).

5.4 HYPOTHESES SUR LE MODE D'ACTION DU MODULE MYB-BHLH-WDR

L'ensemble des analyses fonctionnelles réalisées sur les facteurs MYB et bHLH impliqués dans la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes chez de nombreuses espèces végétales ou dans la régulation des autres voies dépendant de TTG1 chez *A. thaliana*, a permis de proposer un modèle d'action du module MYB-bHLH-WDR (Figure 17 ; Mol *et al.*, 1998 ; Payne *et al.*, 2000). Dans ce modèle, l'interaction entre le facteur MYB et le facteur bHLH serait responsable de la reconnaissance spécifique et de l'activation des gènes cibles dans le noyau. Par contre, la fonction de la protéine à domaine WDR est moins bien comprise, principalement parce que la majorité de sa séquence est occupée par le domaine WDR et qu'aucun autre domaine fonctionnel n'a été identifié jusqu'à présent. L'hypothèse privilégiée est liée à son homologie de structure avec la sous-unité G β des GTPases hétérotrimériques, suggérant que la protéine à domaine WDR pourrait être le composant d'une voie de signalisation cytoplasmique, aboutissant à l'activation des facteurs de transcription (de Vetten *et al.*, 1997). Cette activation pourrait se faire par une modification post-traductionnelle qui reste à préciser. Etant donné les résultats d'interaction directe obtenus entre plusieurs protéines WDR et des facteurs bHLH, certains ont suggéré que ces facteurs pourraient constituer la cible principale de la régulation par la protéine WDR. En accord avec cette hypothèse, les inhibiteurs de la transduction par les protéines G sont capables de stopper l'activation de la production des anthocyanes provoquée par un stimulus lumineux (Bowler *et al.*, 1994 a-b).

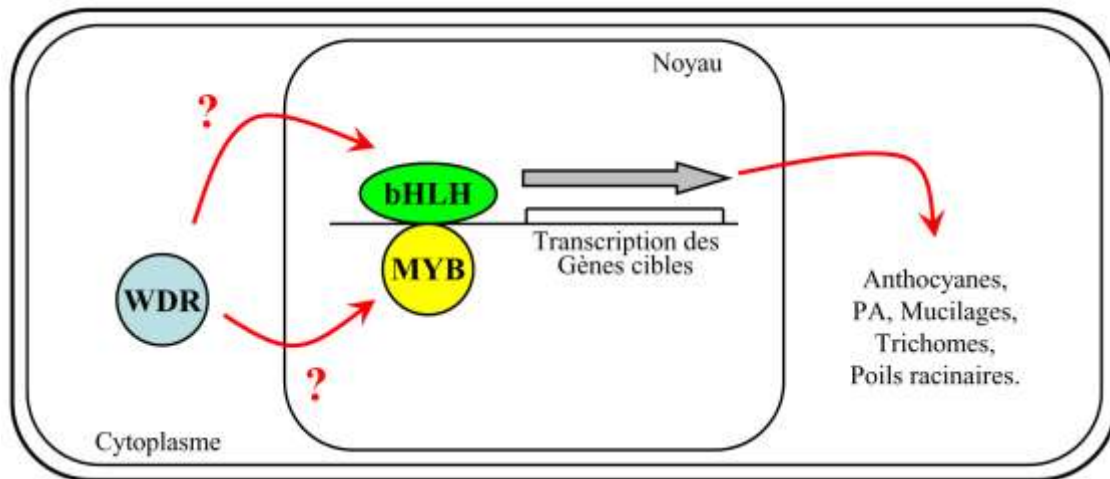


Figure 17 : Hypothèses sur le mode d'action des modules MYB-bHLH-WDR chez les plantes (d'après Mol *et al.*, 1998)

Le complexe formé par les facteurs MYB et bHLH serait responsable de l'activation spécifique de la transcription de gènes cibles. La protéine à domaine WDR ne serait pas un facteur de transcription proprement dit mais elle régulerait l'activité du complexe MYB/bHLH par interaction directe avec celui-ci. Elle pourrait faire partie d'une voie de signalisation à localisation cytoplasmique.

6 ANALYSE DES INTERACTIONS ENTRE TT2, TT8, TTG1 ET LE PROMOTEUR DE *BAN*

Cette section est constituée par un article publié dans la revue *The Plant Journal* (2004) 39, 366-380:

TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*

Antoine Baudry¹, Marc Heim², Bertrand Dubreucq¹, Michel Caboche¹, Bernd Weisshaar² and Loïc Lepiniec¹

¹ *Seed Biology Laboratory, UMR 204 INRA/INAPG, Jean-Pierre Bourgin Institute, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France and*

² *Max-Planck-Institute for Plant Breeding Research, Carl-von-Linne-Weg 10, D-50829 Köln, Germany*

6.1 RESUME DE L'ARTICLE

Des résultats préalables à cette étude ont montré que TT2, TT8 et TTG1 sont trois régulateurs nécessaires à l'activation du gène *BAN* et justifiaient de s'intéresser à une possible collaboration entre ces facteurs de transcription pour conférer le profil d'expression caractéristique de cette enzyme de biosynthèse des PA. Un ensemble de méthodes de génétique moléculaire ont été utilisées afin d'obtenir des éléments d'information *in planta* mais aussi de décomposer les interactions entre ces protéines dans un système hétérologue adapté, la levure (méthodes du simple-, double-, et triple-hybride). Tout d'abord, des plantes exprimant des fusions traductionnelles entre TT2, TT8, TTG1 et le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) ont permis de montrer que ces trois régulateurs agissent tous au même niveau, c'est-à-dire directement sur la transcription de *BAN*. L'analyse des interactions entre TT2, TT8 et TTG1 par la méthode du double hybride a montré que ces protéines interagissent simultanément pour la formation d'un complexe stable à trois composants. Cependant, dans des expériences de simple-hybride, TT2 et TT8 seraient suffisants pour reconnaître spécifiquement et interagir avec la région promotrice de *BAN*. Des éléments sur la fonction de TTG1 dans ce complexe ont ensuite été obtenus par la méthode de transfection de protoplastes d'*A. thaliana*. En effet dans ce système, l'activité du complexe TT2-TT8 est

corrélée au niveau d'expression de TTG1, avec une augmentation de la transcription de *BAN* quand TTG1 est surabondant. Finalement, l'importance de TTG1 pour l'activité du complexe a été confirmée *in planta*. En effet, quand TT2 est exprimé de façon ectopique, il est suffisant pour induire la transcription de *BAN* mais seulement dans les tissus où TTG1 est lui-même déjà présent.

6.2 INTERPRETATION DES RESULTATS D'INTERACTIONS PROTEINE-PROTEINE ENTRE TT2, TT8 ET TTG1

L'un des principaux résultats présenté dans cette étude est celui de la formation d'un complexe stable entre TT2, TT8 et TTG1. Ces interactions, comme pour de nombreux enhanceosomes déjà décrits chez les eucaryotes (Singh, 1998), semblent entraîner une modification de l'activité de chacun des membres du complexe et seraient fondamentales dans les mécanismes d'activation spécifique de la biosynthèse des PA chez *A. thaliana*.

6.2.1 Interaction entre TT2 et TT8

La principale conséquence de l'interaction entre TT2 et TT8 est la reconnaissance spécifique du promoteur de *BAN* par le complexe TT2-TT8. La plupart des aa du domaine MYB de C1, qui sont responsables de l'interaction avec R (bHLH ; Grotewold *et al.*, 2000), sont conservés dans le domaine MYB de TT2 (Nesi *et al.*, 2001) et sont donc potentiellement responsables de l'interaction directe avec TT8. Dans nos travaux, la protéine C1 est la seule protéine MYB, parmi les protéines les plus proches de TT2, capable d'activer *BAN* et ceci en combinaison avec Sn (bHLH), ce qui suggère une forte homologie fonctionnelle entre C1 et TT2. Il est donc probable que l'activité de TT8 soit de modifier les propriétés de liaison à l'ADN de TT2, comme il a été montré pour l'interaction entre C1 et R (Grotewold *et al.*, 2000). Des activités similaires ont été observées *in planta* pour les combinaisons TT2/TT8, TT2/EGL3 et dans une moindre mesure pour TT2/GL3, ce qui confirme une conservation du mode d'action de ces bHLH chez *A. thaliana* (Zhang *et al.*, 2003 ; Bernhardt *et al.*, 2003). Néanmoins, la paire TT2/TT8 s'est révélée la plus efficace pour l'activation de *BAN*, ce qui pourrait indiquer une affinité particulière de TT8 pour TT2 et/ou le promoteur de *BAN*.

Mais la spécificité du complexe pour l'activation de *BAN* semble conférée plus particulièrement par TT2 car c'est la seule protéine MYB, parmi les protéines homologues

chez *A. thaliana*, capable d'activer significativement la transcription de *BAN in planta*. Ce rôle de TT2 dans la spécificité de l'activation de *BAN* avait déjà été suggéré par l'observation de corrélations entre les cinétiques d'expression de *TT2* et de *BAN* dans les cellules des téguments accumulant les PA (Nesi *et al.*, 2001 ; Debeaujon *et al.*, 2003). Cette spécificité pourrait s'expliquer par une affinité particulière du domaine MYB de TT2 pour les séquences cis-régulatrices présentes dans la région promotrice de *BAN*. Par exemple, les expériences de double-hybride ont montré que, à la différence des autres facteurs MYB, TT2 est capable de former des homodimères, cette propriété pourrait donc être essentielle pour la liaison de TT2 au promoteur de *BAN*.

Un autre rôle important de TT2 est l'activation de la transcription grâce à la présence d'un domaine d'activation dans sa séquence, mis en évidence lors des expériences de double-hybride. La fonctionnalité de ce domaine semble indépendante de la présence de TT2 dans le complexe avec TT8 et TTG1. Une activité similaire avait été mise en évidence pour des protéines MYB comme C1, GL1 et WER (Goff *et al.*, 1991 ; Lee et Schiefelbein, 2001).

6.2.2 Interaction entre TT8 et TTG1

La seconde interaction importante pour la fonctionnalité du complexe TT2-TT8-TTG1 est l'interaction entre TT8 et TTG1. Les résultats de double-hybride indiquent que l'affinité entre ces deux protéines est élevée. Des analyses par des méthodes génétiques avaient suggéré très tôt que le rôle de TTG1 est de réguler l'activité de protéines de la famille des bHLH (Lloyd *et al.*, 1992 ; Payne *et al.*, 2000). Nous avons pu confirmer cette hypothèse en comparant la fonctionnalité de TT8 et Sn au cours d'expériences de co-transformation de protoplastes. Même si le rôle de cette interaction reste à préciser, nos résultats suggèrent que TTG1 n'est pas nécessaire pour la reconnaissance des cibles de TT2 et TT8. En effet, en simple-hybride, l'expression de TT2 et TT8 a été suffisante pour observer une interaction significative de ces protéines avec le promoteur de *BAN*. De plus, nous n'avons pas détecté d'effet de la co-expression de TTG1 sur l'intensité d'activation du gène rapporteur *HIS3*, ce qui suggère que le rôle de TTG1 ne serait pas non plus d'augmenter l'affinité de la liaison du complexe au promoteur.

Il est possible que TT8 influence aussi l'activité de TTG1 en agissant sur sa localisation sub-cellulaire. En effet, les premiers résultats de localisation obtenus pour AN11, l'homologue de TTG1 chez le pétunia suggéraient une localisation strictement cytoplasmique de cette protéine (de Vetten *et al.*, 1997). Mais, des résultats récents concernant PfWD

indiquent la possibilité de la translocation de ce type de protéines WDR après interaction avec une protéine bHLH (Sompornpailin *et al.*, 2002). De la même façon, l'interaction entre TT8 et TTG1 pourrait être à l'origine de la translocation de TTG1 dans le noyau des cellules végétales. D'ailleurs, des résultats préliminaires montrent que TTG1 peut pénétrer dans le compartiment nucléaire (M. Heim, M. Hulskamp et B. Weisshaar, communication personnelle).

6.2.3 Interaction entre TT2 et TTG1

Un résultat surprenant a été celui de la détection d'une interaction entre TT2 et TTG1. Par des analyses similaires en double-hybride, il n'a pas été révélé d'interaction entre TTG1 et GL1/WER (Payne *et al.*, 2000 ; Bernhardt *et al.*, 2003), ou entre AN11 et AN2 (Kroon, 2004). Cette différence de résultats peut provenir du fait que cette interaction, influencée par la conformation des protéines de fusion (seulement la combinaison de BD-TT2 et AD-TTG1 a montré une interaction), est sans doute faible et, en conséquence, difficile à détecter en double-hybride. De plus, une particularité de la protéine TT2 a peut être favorisé la mise en évidence de cette interaction. TT2 possède un domaine d'activation dont l'activité est faible dans la levure, ce qui nous a permis d'effectuer l'analyse des interactions avec la séquence complète de la protéine TT2. Au contraire, pour la protéine AN2 de pétunia, un domaine d'activation de force équivalente au domaine AD de la protéine GAL4 a été rapporté (Kroon, 2004). Les analyses de double hybride ont alors été effectuées avec une version tronquée de cette protéine, entraînant peut-être une perturbation de sa structure, qui pourrait expliquer une absence de détection de l'interaction avec AN11 (Kroon, 2004). De la même façon, la force du domaine d'activation de GL1 a entraîné l'utilisation d'une protéine tronquée, et pour WER, Bernhardt et ses collaborateurs ont préféré écarter la protéine de fusion BD-WER (Payne *et al.*, 2000 ; Bernhardt *et al.*, 2003).

Cette différence fonctionnelle pourrait également provenir d'une véritable spécificité structurale de la protéine TT2 par rapport à GL1, WER et AN2, comme cela est suggéré par la capacité de TT2 de former des homodimères, à la différence, semble-t-il, des autres MYB. Cette interaction pourrait assurer une plus grande cohésion du complexe entre TT2, TT8 et TTG1, comme nous l'avons montré dans les expériences de triple-hybride. De plus, elle pourrait être à l'origine d'une meilleure efficacité pour l'activation de *BAN in planta*. En accord avec cette hypothèse, lors de la surexpression de TTG1 dans les expériences

d'expression transitoire dans les protoplastes, l'activation de *BAN* a été plus importante pour la combinaison TT2/Sn que pour C1/Sn.

ARTICLE CONSULTABLE DANS LA THÈSE PAPIER

7 ANALYSE DES INTERACTIONS ENTRE TT2, TT8, TTG1 ET LE PROMOTEUR DE TT8

Cette section est constituée par un article publié dans la revue *The Plant Journal* (2006) 46, 768-779:

TT8 controls its own expression in a feedback regulation involving TTG1 and homologous MYB and bHLH factors, allowing a strong and cell-specific accumulation of flavonoids in *Arabidopsis thaliana*

Antoine Baudry, Michel Caboche, and Loïc Lepiniec

Seed Biology Laboratory, UMR 204 INRA/INAPG, Jean-Pierre Bourgin Institute, Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France

7.1 RESUME DE L'ARTICLE

L'objet de cette étude a été de préciser le mode de régulation du gène *TT8* en s'intéressant plus particulièrement aux mécanismes dépendant de *TT2* et *TTG1*. En effet, l'expression de *TT8* est induite par la présence de ses deux autres partenaires dans le module de régulation *TT2-TT8-TTG1*. Tout d'abord, les domaines cellulaires dans lesquels le promoteur de *TT8* est actif ont été définis par l'utilisation d'une fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur *GUS*. Comme attendu, une activité spécifique a été détectée dans les tissus produisant des PA (graine) et des anthocyanes (plantule) mais également dans la couche à mucilages de la graine. Par contre, l'activité du promoteur semble réduite dans les mutants *ttg1-1* et *tt8-1* et, au contraire, une activation ectopique a été révélée dans des plantules sur-exprimant *TT2*. L'utilisation de plantes présentant des fusions entre *TT2*, *TTG1* et *GR* a permis de révéler que ces deux facteurs agissent directement sur la transcription de *TT8*. De plus, dans des expériences de simple hybride *TT2* peut se lier à ce promoteur mais seulement quand *TT8* est lui-même présent et ceci de façon comparable avec les résultats obtenus pour les interactions entre ces facteurs et le promoteur de *BAN*. Plus largement, ce mode de régulation de *TT8* ne semble pas spécifique de la production des PA car d'autres facteurs intervenant dans la production des anthocyanes ou des mucilages sont aussi capables

d'interagir avec ce promoteur (par exemple PAP1, EGL3 et GL3). Par contre, dans les mutants *ttg1-1* et *tt8xgl3xegl3*, un niveau non négligeable de transcrits *TT8* est détecté (correspondant à environ 15% de l'expression du type sauvage) ce qui suggère que d'autres mécanismes sont capables d'activer le promoteur de *TT8* et que le rôle de TT2, TT8 et TTG1 est d'amplifier ainsi que d'étendre les domaines d'expression du gène *TT8*.

7.2 COMMENTAIRES SUR LES CIBLES GENETIQUES DU MODULE DE REGULATION TT2-TT8-TTG1

L'un des objectifs de ce travail consistait à identifier des cibles directes du complexe formé par TT2, TT8 et TTG1. Ces cibles peuvent être classées en deux catégories : les gènes codant pour les enzymes de la biosynthèse des PA et le gène de régulation *TT8*.

7.3 LES ENZYMES DE BIOSYNTHESE DES PA

Dans un premier temps, nous nous sommes concentrés sur la caractérisation de la relation entre TT2, TT8, TTG1 et le gène *BAN* en montrant que ces trois protéines agissent de façon directe sur la transcription de *BAN*, par liaison à son promoteur. D'autres cibles directes ont également pu être identifiées dans la voie de biosynthèse des PA : la *CHS* et la *DFR*. Un effet de TT2, TT8 et TTG1 avait déjà été mis en évidence sur l'expression de la *DFR* (Nesi *et al.*, 2000), mais le résultat concernant la *CHS* est plus inattendu. Dans l'attente d'une confirmation, ce dernier résultat suggère que le complexe de régulation formé par TT2, TT8 et TTG1 pourrait aussi être impliqué dans l'activation des gènes codant pour des enzymes intervenant précocement dans la voie de biosynthèse des PA (i.e. *CHS*, *CHI*, *F3H*, et *F3'H*) et ainsi contrôler l'ensemble des étapes aboutissant à la production des précurseurs de PA (flavan-3,4-diols et flavan-3-ols). L'existence de mécanismes redondants pour la régulation de l'expression des gènes précoces pourrait expliquer pourquoi ils n'ont pas été identifiés comme des cibles possibles de TT2, TT8 et TTG1 par les analyses d'expression par RT-PCR dans les mutants *tt2*, *tt8* et *ttg1* (Nesi, 2001).

7.4 IMPORTANCE DE LA BOUCLE D'AUTO-ACTIVATION REGULANT TT8

Des résultats indiquent que le gène *TT8* est une autre cible importante du complexe formé par *TT2*, *TT8* et *TTG1*. Ils suggèrent également l'existence d'une boucle d'auto-activation contrôlant le niveau d'expression de ce gène de façon directe, notamment par liaison au promoteur de *TT8* dans le cas de *TT2* et *TT8*. Tout d'abord, ce rétrocontrôle positif pourrait permettre de garantir une activation rapide, spécifique et à un niveau élevé des gènes codant pour les enzymes de biosynthèse des PA, en assurant une expression optimale de *TT8* dans les cellules où *TT2* et *TTG1* sont présents. Cette boucle pourrait aussi constituer un point de contrôle supplémentaire permettant de moduler le niveau d'activation des enzymes de biosynthèse des flavonoïdes en réponse à différents stress. En effet, les expériences de surexpression de *R*, *Lc* et *DELILA* chez le tabac et *A. thaliana* ont montré que le niveau d'expression *in planta* de la bHLH a un effet limitant sur l'activité du complexe MYB/bHLH (Lloyd *et al.*, 1992 ; Mooney *et al.*, 1995 ; Bradley *et al.*, 1998). On peut donc imaginer que dans certaines conditions, une optimisation de l'efficacité du rétrocontrôle de l'expression de *TT8* pourrait être à l'origine d'une modification du niveau de biosynthèse des flavonoïdes chez les plantes. L'effet activateur de nombreux stress (lumière, blessure et pathogènes) sur la production des anthocyanes est bien caractérisé (Winkel-Shirley, 2002). En ce qui concerne la biosynthèse des PA, des résultats récents ont montré qu'elle peut être influencée quantitativement par la température chez la moutarde d'Abyssinie (*Brassica carinata* ; Marles *et al.*, 2003 a).

ARTICLE CONSULTABLE DANS LA THÈSE PAPIER

8 A LA RECHERCHE DE REGULATEURS NEGATIFS DE LA BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES

8.1 HYPOTHESES SUR L'EXISTENCE DE REGULATEURS NEGATIFS DU MODULE TT2-TT8-TTG1

Plusieurs résultats présentés dans les chapitres précédents suggèrent que des régulateurs négatifs agissant sur le module TT2-TT8-TTG1 pourraient exister. Notamment, ces mécanismes permettraient d'expliquer le rôle de TTG1 et ils participeraient au contrôle de la spécificité de la production des flavonoïdes *in planta*.

8.1.1 Hypothèse sur la fonction de la protéine TTG1

Nos résultats indiquent que TTG1 est un co-activateur du complexe de facteurs de transcription formé par TT2 et TT8. Les résultats d'interaction protéine-protéine suggèrent que son action sur la biosynthèse des PA s'effectue par interaction directe avec TT2 et TT8, en affectant principalement la fonctionnalité de la protéine TT8 *in planta*. Cependant, TTG1 ne semble pas agir sur la liaison de TT2 et TT8 à l'ADN. De plus, la différence d'activité du complexe TT2/TT8 dans la levure et *in planta* suggère l'existence d'un mécanisme pouvant limiter l'action de ces protéines chez *A. thaliana* et auquel pourrait échapper la protéine R de maïs (qui est une bHLH pouvant compléter le mutant *tgl1* ; Lloyd *et al.*, 1994). TTG1 ne présente pas dans sa séquence de domaine fonctionnel caractéristique d'une activité enzymatique pouvant être à l'origine d'une modification post-traductionnelle de TT8. C'est pourquoi, on peut envisager plutôt que l'interaction entre TTG1 et TT8 pourrait interférer avec un mécanisme spécifique de limitation de l'activité de TT8. Par exemple, un mécanisme a été décrit pour la protéine p300/CBP qui est un co-activateur du facteur de transcription SREBP intervenant dans la régulation du métabolisme du cholestérol chez les mammifères (Sundqvist et Ericsson, 2003 ; Figure 18). Après activation de ses cibles, une ubiquitination sur des résidus de lysine provoque l'inactivation de SREBP en induisant sa dégradation par le protéasome. L'interaction de SREBP avec p300/CBP permet de prévenir cette ubiquitination en provoquant une acétylation préalable des résidus de lysine et elle prolonge ainsi l'activité transcriptionnelle de SREBP. De la même façon, TTG1 pourrait agir en augmentant la stabilité de TT8 *in planta* en interférant avec sa prise en charge par le protéasome. Sans nécessairement induire une modification post-traductionnelle de TT8, comme la protéine

p300/CBP, TTG1 pourrait agir par compétition avec une protéine à activité ubiquitine-ligase de type E3. En effet, le domaine WDR est présent dans de nombreuses protéines à activité ubiquitine-ligase de type E3 dans lesquelles il est responsable de la spécificité de la reconnaissance de la protéine ciblée par l'ubiquitination (Smalle et Vierstra, 2004).

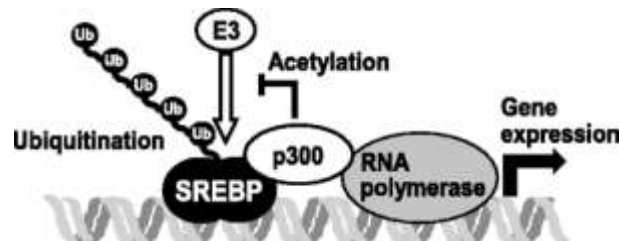


Figure 18 : Rôle de p300/CBP dans la stimulation de la transcription des gènes régulés par SREBP (Sundqvist et Ericsson, 2003).

Les membres de la famille des facteurs de transcription de type SREBP sont ubiquitinés puis dégradés par le protéasome après avoir induit la transcription de leurs cibles. Cependant, l'acétylation des sites d'ubiquitination (résidus lysine) de SREBP par p300/CBP permet d'éviter son ubiquitination et de prolonger son action.

8.1.2 Rôle de TT2 dans la spécificité de l'accumulation des PA

Dans le complexe formé par TT2, TT8 et TTG1, l'élément contrôlant la spécificité tissulaire de l'accumulation des PA est la protéine TT2. Tout d'abord, la cinétique d'apparition des transcrits de *BAN* et de la *DFR* est fortement corrélée à l'apparition des transcrits de *TT2* dans la graine (Nesi, 2001). Ensuite, l'expression de *TT2* dans les téguments s'effectue suivant un profil similaire à celle de *BAN* en étant limitée aux cellules accumulant les PA (Debeaujon *et al.*, 2003). Pour finir, nous avons montré que cette spécificité est liée à une affinité particulière de la protéine TT2 pour la région promotrice de *BAN*. Cependant, la comparaison de l'activité du promoteur de *TT2* avec l'activité du promoteur de *BAN* révèle quelques différences, notamment au stade globulaire du développement de l'embryon (Figure 19). A ce stade, le promoteur de *BAN* est activé dans l'ensemble des cellules accumulant les PA alors que le promoteur de *TT2* est actif principalement dans les régions 1, 3 et dans les parties micropylaire et chalazale de la région 2. Cette différence suggère que la protéine TT2 est peut-être capable de diffuser afin d'activer le promoteur de *BAN* dans l'ensemble de l'endothélium. D'ailleurs, cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi dans le mutant *tt16*, une activation ectopique de *BAN* a été observée dans la couche à mucilage (Debeaujon *et al.*, 2003). En effet, il est possible que certaines altérations du mutant *tt16* permettent la diffusion d'une faible quantité de la protéine TT2 dans la couche à mucilage où elle activerait

BAN avec TTG1 et TT8 (nous avons montré que *TT8* est fortement exprimé dans cette couche cellulaire).

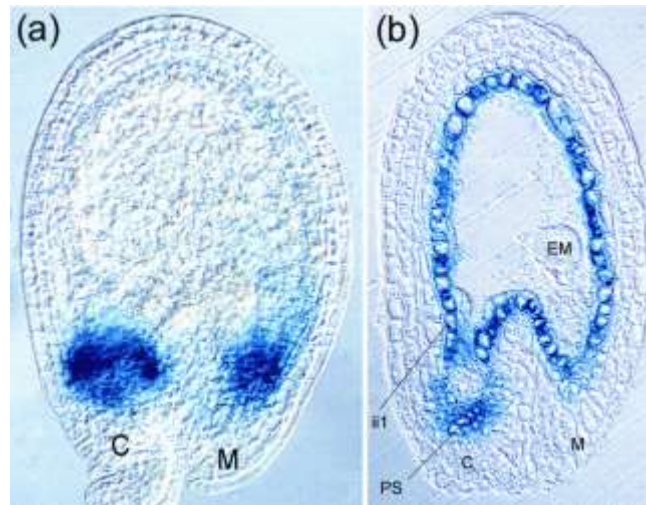


Figure 19 : Comparaison de l'activité des promoteurs de *TT2* et *BAN* (d'après Debeaujon *et al.*, 2003)

L'activité des promoteurs de *TT2* (a) et *BAN* (b) est présentée au stade globulaire de développement de l'embryon. (a) Graine entière, (b) Vue en coupe.

C, chalazae ; EM, embryon ; ii, tégument interne ; M, micropyle ; PS, zone pigmentée de la chalazae.

8.1.3 Modes d'action possibles des régulateurs négatifs

Les données concernant plusieurs régulateurs négatifs de la biosynthèse des phénylpropanoïdes chez différentes espèces végétales et les mécanismes de régulation de l'émergence des trichomes et des poils racinaires chez *A. thaliana*, impliquant des complexes MYB-bHLH-TTG1, nous permettent d'envisager plusieurs mécanismes possibles à l'origine d'une limitation de l'activité du complexe TT2-TT8-TTG1.

Tout d'abord, plusieurs facteurs de transcription régulant la voie des phénylpropanoïdes présentent des domaines inhibiteurs de la transcription dans leur séquence. Par exemple, le gène *AmMYB308* de mufler et son orthologue supposé chez *A. thaliana*, *AtMYB4*, codent pour des protéines MYB possédant un domaine inhibiteur de la transcription dans leur partie N-terminale (Tamagnone *et al.*, 1998 ; Jin *et al.*, 2000). Ces protéines inhibent la production des esters de l'acide sinapique en limitant la transcription de l'enzyme C4H. Un stress causé par des rayonnements UVB lève cette inhibition en induisant une réduction de l'expression de *AmMYB308* et *AtMYB4* et en entraînant une activation de la production des esters de l'acide sinapique qui possèdent des propriétés protectrices vis-à-vis des rayonnements UV (voir § 1.1.1.2). Par un mécanisme similaire d'inhibition de la transcription des gènes codant pour les enzymes de biosynthèse, la protéine MYB de fraisier (*Fragaria*

ananasa), FaMYB1, serait à l'origine d'un arrêt de la production des anthocyanes dans les stades tardifs de la maturation des fraises (Aharoni *et al.*, 2001). Un domaine inhibiteur de la transcription serait également présent dans la séquence de la protéine CPRF1 (bZIP) de persil, régulant l'activation de la transcription de la CHS en réponse à la lumière (Feldbrügge *et al.*, 1994 ; Sprenger-Haussels et Weisshaar, 2000 ; Rügner *et al.*, 2001).

Des protéines de la classe des bHLH avec des propriétés inhibitrices de la production des anthocyanes ont également été identifiées comme la protéine IN1 de maïs (Burr *et al.*, 1996). Bien que le mécanisme d'action de IN1 ne soit pas connu, il a été proposé que cette protéine puisse agir en formant un complexe non fonctionnel avec C1. Ce complexe ne serait pas capable d'activer la transcription des gènes de biosynthèse des anthocyanes mais provoquerait une inactivation de C1 (Burr *et al.*, 1996). Par ailleurs, il est intéressant de constater que IN1 possède une forte homologie de séquence avec TT8 (Nesi *et al.*, 2000), et dans nos expériences d'expression transitoire dans les protoplastes, la combinaison C1/TT8 ne s'est pas révélé capable d'activer la transcription de *BAN*. Il serait intéressant de tester si l'inefficacité de TT8 et d'IN1 à activer l'expression des gènes de biosynthèse des flavonoïdes en combinaison avec C1 est liée à des modes d'action similaires de ces bHLH.

En accord avec l'hypothèse de l'existence de régulateurs négatifs agissant sur la stabilité d'un des membres du complexe MYB-bHLH-WDR, la protéine UPL3/KAKTUS est impliquée dans le contrôle de la formation des trichomes chez *A. thaliana* (Downes *et al.*, 2003 ; El Refy *et al.*, 2003). UPL3 présente un domaine HECT dans sa séquence qui est caractéristique de certaines protéines à activité ubiquitine-ligase de type E3. UPL3 permettrait de limiter le nombre de ramifications et de cycles d'endoréplication des trichomes, et il a été proposé que sa cible soit la protéine GL3 (Downes *et al.*, 2003). En ce qui concerne la biosynthèse des flavonoïdes, l'isolement d'un mutant affecté dans une protéine de type ubiquitine-ligase avec un motif « ring finger » a été rapporté (U.I. Flügge, 7th International Congress of Plant Molecular Biology). Son phénotype serait similaire à celui du mutant *pap1-D* avec une surproduction des anthocyanes dans les parties végétatives (Borevitz *et al.*, 2000).

Le mutant *icx1*, pour « increased chalcone synthase expression 1 », présente également un phénotype suggérant l'importance des mécanismes inhibiteurs de la biosynthèse des flavonoïdes chez *A. thaliana*. Il a été isolé par mutagenèse d'une lignée dans laquelle a été introduite une fusion transcriptionnelle entre le promoteur de la *CHS* et le gène rapporteur *uidA* (Jackson *et al.*, 1995). Chez *icx1*, l'activation de ce construit est augmentée par rapport à la lignée de référence. Une caractérisation approfondie du phénotype d'*icx1* a montré que le niveau d'expression de plusieurs gènes codant pour des enzymes de la biosynthèse des

flavonoïdes est augmenté par rapport au type sauvage, cette différence est fortement augmentée à la suite de stress (rayonnements UVB, température et saccharose ; Wade *et al.*, 2003). De plus, *icx1* présente une altération de la forme des feuilles, un nombre réduit de trichomes et une perturbation du développement racinaire. Ce phénotype complexe suggère qu'ICX1 aurait un rôle dans la régulation de plusieurs voies épidermiques, mais à la différence de TTG1, ce serait un rôle inhibiteur (Wade *et al.*, 2003).

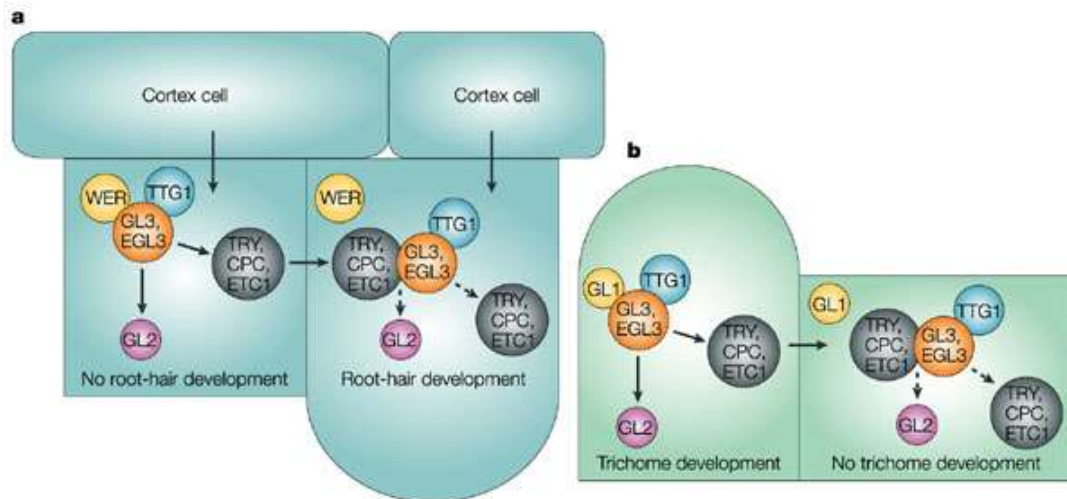


Figure 20 : Comparaison des mécanismes de formation des trichomes et des poils racinaires chez *A. thaliana* (Hülkamp, 2004)

La formation des poils racinaires (a) semble être influencée par des informations de position car elle est initiée uniquement dans les cellules présentes à la jonction entre deux cellules corticales. La plupart des gènes impliqués dans la formation des poils racinaires régule également le développement des trichomes (b). Cependant, bien que les cellules exprimant *GLABRA2* (*GL2*) dans l'épiderme des feuilles soient à l'origine de la formation des trichomes, l'expression de *GL2* dans l'épiderme des racines inhibe la formation des poils racinaires. Dans les deux systèmes, il a été proposé que l'expression de *GL2* soit activée par un complexe formé par une protéine MYB (WEREWOLF -*WER*- dans la racine et *GL1* dans les feuilles), un facteur de type bHLH (*GL3* et *ENHANCER OF GLABRA3* - *EGL3*) et la protéine *TTG1* à domaine WDR. Ce complexe activerait également les régulateurs négatifs *TRIPTYCHON* (*TRY*), *CAPRICE* (*CPC*) et *ENHANCER OF TRY AND CPC* (*ETC1*). La diffusion de ces protéines induirait une inhibition du complexe activateur dans les cellules voisines, par compétition avec *WER* ou *GL1* pour la liaison avec les facteurs bHLH.

Enfin, un mécanisme d'inhibition à l'origine de la spécificité de l'activation de la production des trichomes et des poils racinaires pourrait peut-être également participer au contrôle de l'accumulation des PA dans la graine (Figure 20). Dans ce mécanisme, plusieurs protéines jouent un rôle important : *TRIPTYCHON* (*TRY*), *CAPRICE* (*CPC*) et *ENHANCER OF TRY AND CPC1* (*ETC1* ; Wada *et al.* 1997 ; Schellmann *et al.*, 2002 ; Kirik *et al.*, 2004). La présence d'un domaine MYB avec une seule répétition et l'absence d'un domaine d'activation ou de répression de la transcription dans leur séquence, suggèrent que *TRY*, *CPC* et *ETC1* ne sont pas de véritables facteurs de transcription. Par contre, leur action inhibitrice serait liée à une compétition avec *WER* ou *GL1* vis-à-vis de l'interaction

avec GL3 ou EGL3, en provoquant la formation d'un complexe inactif (Esch *et al.*, 2003). La diffusion de TRY, CPC et ETC1 serait ainsi à l'origine d'une inhibition de l'activité de WER et GL1 dans certaines cellules (Figure 20). L'isolement de MYBx, une protéine homologue de TRY, CPC et ETC1 impliquée dans la biosynthèse des anthocyanes chez le pétunia suggère que des mécanismes similaires pourraient, d'une façon générale, contrôler l'activité des modules MYB-bHLH-WDR chez les plantes (Kroon, 2004). Un mécanisme similaire pourrait contrôler l'activité de la protéine TT2, en inhibant son activité en dehors de l'endothélium.

8.2 CARACTERISATION D'UN REGULATEUR NEGATIF DE LA BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES

Cette section est constituée par un article publié dans la revue *The Plant Journal* (2008) 55, 940-953:

MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*

Dubos C^{1,2}, Le Gourrierc J^{1,2}, Baudry A¹, Huep G³, Lanet E⁴, Debeaujon I^{1,2}, Routaboul JM^{1,2}, Alboresi A⁴, Weisshaar B³, Lepiniec L^{1,2}

¹*INRA and*

²*AgroParisTech, UMR204, Seed Biology Laboratory, IJPB Route de Saint-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France*

³*Department of Biology, Bielefeld University, D-33594 Bielefeld, Germany, and*

⁴*Laboratoire de Génétique et de Biophysique des Plantes (LGBP), UMR 6191 CNRS-CEA-Université de la Méditerranée, Faculté des Sciences de Luminy, France*

8.2.1 Résumé de l'article

A l'origine de ce travail, nous voulions nous intéresser aux MYB appartenant à la famille de TRY et CPC afin d'étudier si de la même façon que pour la production des trichomes et des poils racinaires, ces régulateurs négatifs sont aussi impliqués dans la production des flavonoïdes. Pour cela, des mutants correspondant à chacun des membres de cette famille (c'est-à-dire TRY, CPC, ETC1, ETC2, ETC3 et MYBL2) ont été caractérisés et une étude des domaines d'expression de chacun des membres de cette famille a été réalisée. Ainsi, une suraccumulation des anthocyanes a été détectée chez les plantes mutées dans le gène *MYBL2* et après surexpression, celui-ci est capable d'interférer avec la production des

PA et de réduire significativement leur accumulation dans la graine. Ces modifications ont pu être corrélées à des changements dans les niveaux d'expression des enzymes de biosynthèse ainsi que de certains régulateurs. La capacité de MYBL2 à interagir avec plusieurs bHLH dans des expériences de double hybride ainsi que son effet inhibiteur sur l'activité de la paire TT2-TT8 dans des expériences de transfections de cellules d'*A. thaliana* suggèrent qu'il peut interférer directement avec la formation de ce complexe de facteurs de transcription et en inhiber l'activité. Finalement, la caractérisation des domaines d'expression de *MYBL2* et le fait que son expression est inhibée par de fortes intensités lumineuses indiquent qu'il pourrait être impliqué dans la modulation de la production des flavonoïdes en réponse à la lumière. La plupart des résultats que nous avons obtenus concernant la caractérisation de *MYBL2* ont été confirmés par une seconde publication rédigée par une équipe japonaise (Matsui *et al.*, 2008).

ARTICLE CONSULTABLE DANS LA THÈSE PAPIER

9 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

9.1 POURSUITE DE LA CARACTERISATION DES INTERACTIONS ENTRE TT2, TT8 ET TTG1

Plusieurs approches sont possibles afin de confirmer et d'approfondir les résultats d'interactions par des méthodes d'analyse *in vitro* et *in planta*. Comme cela a déjà été évoqué, il est important dans ces approches de pouvoir disposer de protéines fonctionnelles. C'est pourquoi, il pourrait être intéressant d'utiliser les protéines de fusion avec AD ou BD purifiées à partir d'extraits de levure pour les études d'interaction *in vitro* par les méthodes de retard de migration sur gel et de co-précipitation. Des extraits de protéines nucléaires obtenus à partir de protoplastes de cultures de cellules d'*A. thaliana* surexprimant TT2, TT8 et/ou TTG1 pourraient également être utilisés pour ces expériences et afin de disposer d'un complexe fonctionnel. De la même façon, pour les analyses *in planta*, il serait envisageable d'effectuer la purification du complexe à partir des plantes exprimant les protéines de fusion TT2-GR et TTG1-GR en utilisant des anticorps commerciaux dirigés contre la séquence GR. De plus, même si des résultats préliminaires obtenus avec des protéines en fusion avec le TAP n'ont pas été positifs, d'autres systèmes de purification pourraient être testés. Cette dernière approche, menée en parallèle avec des cribles par la méthode du double-hybride, pourrait permettre d'isoler de nouveaux partenaires de TT2, TT8 et TTG1.

L'interaction entre protéines MYB et bHLH a été bien caractérisée avec l'identification des aa du domaine MYB de C1 responsables de l'interaction avec R (Grotewold *et al.*, 2000). Une étude similaire pourrait être menée en s'intéressant aux aa importants dans la région N-terminale de TT8, permettant l'interaction avec le domaine MYB de TT2. Notamment, une analyse comparative de TT8, IN1 et R pourrait permettre d'identifier les éléments dans la structure de ces bHLH à l'origine de la spécificité de l'interaction avec TT2 et C1 pour l'activation de la transcription des gènes de biosynthèse.

9.2 RECHERCHE SYSTEMATIQUE DES CIBLES DE TT2, TT8 ET TTG1

De la même façon que pour *BAN* et *TT8*, il serait nécessaire de tester l'ensemble des gènes connus intervenant dans la biosynthèse des PA (e.g. *CHS*, *CHI*, *DFR*, *F3H*, *F3'H*, *TT10*, *TT12*, *TT15*, *TT18* et *TT19*) afin de savoir si ils constituent aussi des cibles directes des

régulateurs TT2, TT8 et TTG1. En parallèle, une analyse systématique par simple-hybride de la liaison de TT2 et TT8 au promoteur de ces gènes pourrait être effectuée.

De plus, les plantes *35S:TT2-GR* constituent un matériel particulièrement adapté à l'identification de nouvelles cibles de TT2 pouvant intervenir dans la biosynthèse des PA dans la graine d'*A. thaliana*. En effet, des extraits d'ARNm de siliques de ces plantes pourraient être utilisés pour hybrider des filtres ou des microarray. La comparaison des résultats obtenus dans différentes conditions (présence de DEX et/ou de CHX) permettrait de faire la différence entre les cibles directes et indirectes de TT2. Cependant, afin de se placer dans des conditions les plus proches de celles rencontrées chez le sauvage, une substitution du promoteur *35S* par le promoteur de *TT2* serait préférable. Cette précaution pourrait aussi limiter les risques d'échappement de la protéine de fusion TT2-GR au système de rétention dans le cytoplasme.

Une autre méthode complémentaire pour la recherche des cibles de TT2 pourrait être utilisée : la méthode d'immunoprécipitation de chromatine. Cette méthode a déjà été utilisée avec succès pour la purification *in planta* des complexes formés entre les facteurs de transcription AGL15 et LEAFY avec leurs cibles d'ADN (Wang *et al.*, 2002 ; William *et al.*, 2004). Dans ce but, des anticorps dirigés contre TT2 ou contre le domaine GR pourraient être utilisés.

9.3 CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE TT8

Plusieurs expériences sont envisageables afin de poursuivre la caractérisation de la régulation de l'expression de *TT8*. L'analyse fonctionnelle du promoteur pourrait être menée *in planta* par l'étude de l'activité de plusieurs construits *TT8:uidA* et le rôle de certaines séquences cis-régulatrices dans l'interaction avec TT2 et TT8 pourrait être confirmé par des expériences de simple-hybride et de retard de migration sur gel. De plus, la recherche d'autres régulateurs de *TT8* pourrait être effectuée par des cribles par la méthode du simple-hybride ou par une approche génétique de mutagenèse des plantes présentant les construits *TT8:uidA*.

Il serait également important de mener une analyse approfondie de la fonctionnalité de la protéine TT8 *in planta*. L'étude de la localisation et de la stabilité de TT8 pourrait être effectuée par la réalisation de fusions traductionnelles entre TT8 et la GFP, et la caractérisation du comportement de ces fusions dans plusieurs fonds génétiques mutants (par exemple *tt2*, *tt8*, *ttg1* et *icx1*). L'identification des éléments dans la séquence de TT8 responsables de la limitation de son activité *in planta* pourrait être réalisée par la construction de protéines chimères entre TT8 et R, puis l'analyse de la fonctionnalité de ces protéines dans

des expériences d'expression transitoire en protoplastes. En parallèle, il serait intéressant d'identifier les domaines de TT8 responsables de l'interaction avec TTG1, par exemple en testant des versions tronquées de la protéine TT8 dans des expériences de double-hybride avec TTG1.

10 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003). *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**, 63-78.
- Abrahams, S., Tanner, G.J., Larkin, P.J., and Ashton, A.R.** (2002). Identification and biochemical characterization of mutants in the proanthocyanidin pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **130**, 561-576.
- Abrahams, S., Lee, E., Walker, A.R., Tanner, G.J., Larkin, P.J., and Ashton, A.R.** (2003). The *Arabidopsis* *TDS4* gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development. *Plant J.* **35**, 624-636.
- Aerts, R.J., Barry, T.N., and McNabb, W.C.** (1999). Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agr. Ecosys. Environ.* **75**, 1-12.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments** (2007). Avis de l'AFSSA sur un projet relatif à l'emploi de substances à but nutritionnel ou physiologique et de plantes et préparations de plantes dans la fabrication de compléments alimentaires. Saisine n°2007-SA-0231. www.afssa.fr
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments** (2005). Sécurité et bénéfices des phyto-estrogènes apportés par l'alimentation - Recommandations. www.afssa.fr
- Aharoni, A., De Vos, C.H., Wein, M., Sun, Z., Greco, R., Kroon, A., Mol, J.N., and O'Connell, A.P.** (2001). The strawberry FaMYB1 transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco. *Plant J.* **28**, 319-332.
- Albert, S., Delseny, M., and Devic, M.** (1997). *BANYULS*, a novel negative regulator of flavonoid biosynthesis in the *Arabidopsis* seed coat. *Plant J.* **11**, 289-299.
- Alfenito, M.R., Souer, E., Goodman, C.D., Buell, R., Mol, J., Koes, R., and Walbot, V.** (1998). Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell* **10**, 1135-1149.
- Ameer, B., Weintraub, R. A., Johnson, J. V., Yost, R. A., and Roussef, R. L.** (1996) Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clin Pharmacol Ther* **60**, 34-40.
- Appelhagen, I., Huep, G., Lu, G.H., Strompen, G., Weisshaar, B., and Sagasser, M.** (2010). Weird fingers: functional analysis of WIP domain proteins. *FEBS Lett.* **584**, 3116-3122.
- Arabidopsis Genome Initiative.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Auger, B., Marnet, N., Gautier, V., Maia-Grondard, A., Leprince, F., Renart, M., Guyot, S., Nesi, N., and Routaboul, J.M.** (2010). A detailed survey of seed coat flavonoids in developing seeds of *Brassica napus* L. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 6246-6256.
- Bailey, P.C., Martin, C., Toledo-Ortiz, G., Quail, P.H., Huq, E., Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., and Weisshaar, B.** (2003). Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **15**, 2497-2502.

- Baudry, A., Heim, M., Dubreucq, B., Caboche, M., Weisshaar, B., and Lepiniec, L.** (2004). TT2, TT8, and TTG1 synergistically specify the expression of *BANYULS* and proanthocyanidin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **39**, 366-380.
- Baudry, A., Caboche, M., Lepiniec, L.** (2006). TT8 controls its own expression in a feedback regulation involving TTG1 and homologous MYB and bHLH factors, allowing a strong and cell-specific accumulation of flavonoids in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **46**, 768-779.
- Ballesteros, M.L., Bolle, C., Lois, L.M., Moore, J.M., Vielle-Calzada, J.P., Grossniklaus, U., and Chua, N.H.** (2001). LAF1, a MYB transcription activator for phytochrome A signaling. *Genes Dev.* **15**, 2613-2625.
- Bender, J., and Fink, G.R.** (1998). A Myb homologue, ATR1, activates tryptophan gene expression in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5655-5660.
- Bernhardt, C., Lee, M.M., Gonzalez, A., Zhang, F., Lloyd, A., and Schiefelbein, J.** (2003). The bHLH genes *GLABRA3* (*GL3*) and *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*) specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root. *Development* **130**, 6431-6439.
- Bharti, A.K., and Khurana, J.** (2003). Molecular characterization of *transparent testa* (*tt*) mutants of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Estland) impaired in flavonoid biosynthetic pathway. *Plant Sci.* **165**, 1321-1332.
- Bohm, B.** (1998). Introduction to flavonoids. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, pp.503.
- Bonke, M., Thitamadee, S., Mahonen, A.P., Hauser, M.T., and Helariutta, Y.** (2003). APL regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis*. *Nature* **426**, 181-186.
- Borevitz, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **12**, 2383-2394.
- Bovy, A., de Vos, R., Kemper, M., Schijlen, E., Almenar Pertejo, M., Muir, S., Collins, G., Robinson, S., Verhoeyen, M., Hughes, S., Santos-Buelga, C., and van Tunen, A.** (2002). High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes *LC* and *Cl*. *Plant Cell* **14**, 2509-2526.
- Bowler, C., Neuhaus, G., Yamagata, H., and Chua, N.H.** (1994 a). Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell* **77**, 73-81.
- Bowler, C., Yamagata, H., Neuhaus, G., and Chua, N.H.** (1994 b). Phytochrome signal transduction pathways are regulated by reciprocal control mechanisms. *Genes Dev.* **8**, 2188-2202.
- Bradley, J.M., Davies, K.M., Deroles, S.C., Bloor, S.J., and Lewis, D.H.** (1998). The maize *Lc* regulatory gene up-regulates the flavonoid biosynthetic pathway of petunia. *Plant J.* **13**, 381-392.
- Brown, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A.S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, L., and Muday, G.K.** (2001). Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **126**, 524-535.
- Buer, C.S., and Muday, G.K.** (2004). The *transparent testa4* mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin

- transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. *Plant Cell* **16**, 1191-1205.
- Burbulis, I.E., Iacobucci, M., and Shirley, B.W.** (1996). A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**, 1013-1025.
- Burbulis, I.E., and Winkel-Shirley, B.** (1999). Interactions among enzymes of the *Arabidopsis* flavonoid biosynthetic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 12929-12934.
- Burr, F.A., Burr, B., Scheffler, B.E., Blewitt, M., Wienand, U., and Matz, E.C.** (1996). The maize repressor-like gene *intensifier1* shares homology with the *r1/bl* multigene family of transcription factors and exhibits missplicing. *Plant Cell* **8**, 1249-1259.
- Byrne, M.E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J.M., Dunham, M., Hudson, A., and Martienssen, R.A.** (2000). *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature* **408**, 967-971.
- Carey, C.C., Strahle, J.T., Selinger, D.A., and Chandler, V.L.** (2004). Mutations in the *pale aleurone color1* regulatory gene of the *Zea mays* anthocyanin pathway have distinct phenotypes relative to the functionally similar *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**, 450-464.
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B.H., Hong, X., Agarwal, M., and Zhu, J.K.** (2003). *ICE1*: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **17**, 1043-1054.
- Conner, J., and Liu, Z.** (2000). *LEUNIG*, a putative transcriptional corepressor that regulates *AGAMOUS* expression during flower development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12902-12907.
- Davies, K.M., and Schwinn, K.E.** (2003). Transcriptional regulation of secondary metabolism. *Functional Plant Biology* **30**, 913-925.
- de Pater, S., Pham, K., Memelink, J., and Kijne, J.** (1997). RAP-1 is an *Arabidopsis* MYC-like R protein homologue, that binds to G-box sequence motifs. *Plant Mol. Biol.* **34**, 169-174.
- de Vetten, N., Quattrocchio, F., Mol, J., and Koes, R.** (1997). The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants, and animals. *Genes Dev.* **11**, 1422-1434.
- Debeaujon, I., Leon-Kloosterziel, K.M., and Koornneef, M.** (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **122**, 403-414.
- Debeaujon, I., Peeters, A.J., Leon-Kloosterziel, K.M., and Koornneef, M.** (2001). The *TRANSPARENT TESTA12* gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell* **13**, 853-871.
- Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P., Devic, M., Grandjean, O., Caboche, M., and Lepiniec, L.** (2003). Proanthocyanidin-accumulating cells in *Arabidopsis* testa: regulation of differentiation and role in seed development. *Plant Cell* **15**, 2514-2531.
- Dellaporta, S.L., Greenblatt, I., Kermicle, J., Hicks, J.B., and Wessler, S.** (1988). Molecular cloning of the maize *R-nj* allele by transposon tagging with *Ac*. In *Chromosome structure and*

- function, 18th Stadler Genetic Symposium., J.P. Gustafson and R. Appels, eds (New York: Plenum), pp. 263-282.
- Denekamp, M., and Smeekens, S.C.** (2003). Integration of wounding and osmotic stress signals determines the expression of the *AtMYB102* transcription factor gene. *Plant Physiol.* **132**, 1415-1423.
- Devic, M., Guilleminot, J., Debeaujon, I., Bechtold, N., Bensaude, E., Koornneef, M., Pelletier, G., and Delseny, M.** (1999). The *BANYULS* gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *Plant J.* **19**, 387-398.
- Dixon, R.A.** (2004). Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 225-261.
- Dong, X., Braun, E.L., and Grotewold, E.** (2001). Functional conservation of plant secondary metabolic enzymes revealed by complementation of *Arabidopsis* flavonoid mutants with maize genes. *Plant Physiol.* **127**, 46-57.
- Downes, B.P., Stupar, R.M., Gingerich, D.J., and Vierstra, R.D.** (2003). The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in *Arabidopsis*: UPL3 has a specific role in trichome development. *Plant J.* **35**, 729-742.
- Dubos, C., Le Gourrierec, J., Baudry, A., Huep, G., Lanet, E., Debeaujon, I., Routaboul, J.M., Alboresi, A., Weisshaar, B., and Lepiniec, L.** (2008). MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **55**, 940-953.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., and Lepiniec, L.** (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*. Epub ahead of print.
- El Refy, A., Perazza, D., Zekraoui, L., Valay, J.G., Bechtold, N., Brown, S., Hulskamp, M., Herzog, M., and Bonneville, J.M.** (2003). The *Arabidopsis KAKTUS* gene encodes a HECT protein and controls the number of endoreduplication cycles. *Mol. Genet. Genomics* **270**, 403-414.
- Esch, J.J., Chen, M., Sanders, M., Hillestad, M., Ndkium, S., Idelkope, B., Neizer, J., and Marks, M.D.** (2003). A contradictory *GLABRA3* allele helps define gene interactions controlling trichome development in *Arabidopsis*. *Development* **130**, 5885-5894.
- Fairchild, C.D., Schumaker, M.A., and Quail, P.H.** (2000). HFR1 encodes an atypical bHLH protein that acts in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev.* **14**, 2377-2391.
- Feinbaum, R.L., and Ausubel, F.M.** (1988). Transcriptional regulation of the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase gene. *Mol. Cell Biol.* **8**, 1985-1992.
- Ferreya, M.L., Rius, S., Emiliani, J., Pourcel, L., Feller, A., Morohashi, K., Casati, P., and Grotewold, E.** (2010). Cloning and characterization of a maize UVB inducible flavonol synthase. *Plant J.* **62**, 77-91.
- Field, B., Jordan, F., and Osbourn, A.** (2006). First encounters - deployment of defense related natural products by plants. *New Phytol.* **172**, 193-207.
- Filkowski, J., Kovalchuk, O., and Kovalchuk, I.** (2004). Genome stability of *vtc1*, *tt4*, and *tt5* *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in protection against oxidative stress. *Plant J.* **38**, 60-69.
- Forkmann, G., and Ruhnau, B.** (1987). Distinct substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase from *Petunia hybrida*. *Naturforsch.* **42C**,

- 1146-1148.
- Forkmann, G., and Heller, W.** (1999). Biosynthesis of flavonoids. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*, U. Sankawa, ed (Amsterdam: Elsevier), pp. 713-748.
- Forkmann, G., and Martens, S.** (2001). Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 155-160.
- Friedrichsen, D.M., Nemhauser, J., Muramitsu, T., Maloof, J.N., Alonso, J., Ecker, J.R., Furuya, M., and Chory, J.** (2002). Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth. *Genetics* **162**, 1445-1456.
- Gantet, P., and Memelink, J.,** (2002) Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**, 563-569.
- Gardana, C., Simonetti, P., Berti, C., and Pietta, P.** (2007). Evaluation of propolis polyphenols in humans by liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 3849-3854.
- Goff, S.A., Cone, K.C., and Fromm, M.E.** (1991). Identification of functional domains in the maize transcriptional activator C1: comparison of wild-type and dominant inhibitor proteins. *Genes Dev.* **5**, 298-309.
- Goff, S.A., Cone, K.C., and Chandler, V.L.** (1992). Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize *B* gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes Dev.* **6**, 864-875.
- Gonzalez, A., Mendenhall, J., Huo, Y., and Lloyd, A.** (2009). TTG1 complex MYBs, MYB5 and TT2, control outer seed coat differentiation. *Dev. Biol.* **325**, 412-421.
- Grotewold, E., Drummond, B.J., Bowen, B., and Peterson, T.** (1994). The myb-homologous *P* gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* **76**, 543-553.
- Grotewold, E., Sainz, M.B., Tagliani, L., Hernandez, J.M., Bowen, B., and Chandler, V.L.** (2000). Identification of the residues in the Myb domain of maize C1 that specify the interaction with the bHLH cofactor R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13579-13584.
- Grotewold, E.** (2006). The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 761-780.
- Grotewold, E.** (2008). Transcription factors for predictive plant metabolic engineering: are we there yet ? *Curr. Opin. Biotechnol.* **19**, 138-144.
- Gu, Y.Q., Yang, C., Thara, V.K., Zhou, J., and Martin, G.B.** (2000). Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell* **12**, 771-786.
- Harborne, J.B., and Williams, C.A.** (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.
- Hardtke, C.S., and Deng, X.W.** (2000). The cell biology of the COP/DET/FUS proteins. Regulating proteolysis in photomorphogenesis and beyond ? *Plant Physiol.* **124**, 1548-1557.
- Harmer, S.L., Hogenesch, J.B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., and Kay, S.A.**

- (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* **290**, 2110-2113.
- Hattori, T., Vasil, V., Rosenkrans, L., Hannah, L.C., McCarty, D.R., and Vasil, I.K.** (1992). The *Viviparous-1* gene and abscisic acid activate the *Cl* regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes Dev.* **6**, 609-618.
- Haywood, V., Kragler, F., and Lucas, W.J.** (2002). Plasmodesmata: pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. *Plant Cell* **14 Suppl**, S303-325.
- Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., and Bailey, P.C.** (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 735-747.
- Heisler, M.G., Atkinson, A., Bylstra, Y.H., Walsh, R., and Smyth, D.R.** (2001). *SPATULA*, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein. *Development* **128**, 1089-1098.
- Higginson, T., Li, S.F., and Parish, R.W.** (2003). *AtMYB103* regulates tapetum and trichome development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **35**, 177-192.
- Holton, T.A., and Cornish, E.C.** (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1071-1083.
- Honma, T., and Goto, K.** (2001). Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature* **409**, 525-529.
- Hrazdina, G., Zobel, A.M., and Hoch, H.C.** (1987). Biochemical, immunological, and immunocytochemical evidence for the association of chalcone synthase with endoplasmic reticulum membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8966-8970.
- Huq, E., and Quail, P.H.** (2002). PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signaling in *Arabidopsis*. *Embo J.* **21**, 2441-2450.
- Irani, N.G., Hernandez, J.M., and Grotewold, E.** (2003). Regulation of anthocyanin pigmentation. *Recent Adv. Phytochem.* **37**, 60-78.
- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J.H., and Watanabe, A.** (2001). G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *Plant Cell* **13**, 1891-1905.
- Jackson, J.A., Fuglevand, G., Brown, B.A., Shaw, M.J., and Jenkins, G.I.** (1995). Isolation of *Arabidopsis* mutants altered in the light-regulation of *chalcone synthase* gene expression using a transgenic screening approach. *Plant J.* **8**, 369-380.
- Jacobs, M., and Rubery, P.** (1988). Naturally occurring auxin transport regulators. *Science* **241**, 346-349.
- Jin, H., and Martin, C.** (1999). Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol. Biol.* **41**, 577-585.
- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B., and Martin, C.** (2000). Transcriptional repression by *AtMYB4* controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *Embo J.* **19**, 6150-6161.

- Johnson, C.S., Kolevski, B., and Smyth, D.R.** (2002). *TRANSPARENT TESTA GLABRA2*, a trichome and seed coat development gene of *Arabidopsis*, encodes a WRKY transcription factor. *Plant Cell* **14**, 1359-1375.
- Kang, H.G., Foley, R.C., Onate-Sanchez, L., Lin, C., and Singh, K.B.** (2003). Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid. *Plant J.* **35**, 362-372.
- Kawagoe, Y., and Murai, N.** (1996). A novel basic region/helix-loop-helix protein binds to a G-box motif CACGTG of the bean seed storage protein B-phaseolin gene. *Plant Sci.* **116**, 47-57.
- Kirik, V., Kolle, K., Wohlfarth, T., Misera, S., and Baumlein, H.** (1998). Ectopic expression of a novel MYB gene modifies the architecture of the *Arabidopsis* inflorescence. *Plant J.* **13**, 729-742.
- Kirik, V., Schnittger, A., Radchuk, V., Adler, K., Hulskamp, M., and Baumlein, H.** (2001). Ectopic expression of the *Arabidopsis AtMYB23* gene induces differentiation of trichome cells. *Dev. Biol.* **235**, 366-377.
- Kirik, V., Simon, M., Huelskamp, M., and Schiefelbein, J.** (2004). The *ENHANCER OF TRY AND CPC1* gene acts redundantly with *TRIPTYCHON* and *CAPRICE* in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* **268**, 506-513.
- Kitamura, S., Shikazono, N., and Tanaka, A.** (2004). *TRANSPARENT TESTA 19* is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *Plant J.* **37**, 104-114.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., and Aromaa, A.** (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 560-568.
- Koes, R.E., Quattrocchio, F., and Mol, J.N.M.** (1994). The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *Bioessays* **16**, 123-132.
- Koornneef, M.** (1981). The complex syndrome of *ttg* mutant in *Arabidopsis*. *Arabid. Inf. Serv.* **18**, 45-51.
- Koornneef, M.** (1990). Mutations affecting the testa colour in *Arabidopsis*. *Arabid. Inf. Serv.* **27**, 1-4.
- Kootstra, A.** (1994). Protection from UV-B-induced DNA damage by flavonoids. *Plant Mol. Biol.* **26**, 771-774.
- Kristiansen, K.N.** (1984). Biosynthesis of proanthocyanidins in barley: genetic control of the conversion of dihydroquercetin to catechin and procyanidin. *Carlsberg Res. Comm.*, 503-524.
- Kroon, A.** (2004). Transcription regulation of the anthocyanin pathway in *Petunia hybrida*. Thèse, Vrije Universiteit, pp. 111.
- Kubasek, W.L., Shirley, B.W., McKillop, A., Goodman, H.M., Briggs, W., and Ausubel, F.M.** (1992). Regulation of Flavonoid Biosynthetic Genes in Germinating *Arabidopsis* Seedlings. *Plant Cell* **4**, 1229-1236.
- Kubasek, W.L., Ausubel, F.M., and Shirley, B.W.** (1998). A light-independent developmental mechanism potentiates flavonoid gene expression in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Mol. Biol.* **37**, 217-223.

- Kuno, N., Moller, S.G., Shinomura, T., Xu, X., Chua, N.H., and Furuya, M.** (2003). The novel MYB protein EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE1 is a component of a slave circadian oscillator in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **15**, 2476-2488.
- Landry, L.G., Chapple, C.C., and Last, R.L.** (1995). *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol.* **109**, 1159-1166.
- Lee, M.M., and Schiefelbein, J.** (1999). WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* **99**, 473-483.
- Lee, M.M., and Schiefelbein, J.** (2001). Developmentally distinct MYB genes encode functionally equivalent proteins in *Arabidopsis*. *Development* **128**, 1539-1546.
- Lekli, I., Ray, D., and Das, D. K.** (2010). Longevity nutrients resveratrol, wine and grapes. *Genes Nutr.* **5**, 55-60.
- Lepiniec, L., Devic, M., and Berger, F.** (2004). Genetic and molecular control of seed development in *Arabidopsis*. In *Plant functional genomics*, D. Leister, ed (New York: The Haworth Press).
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.-M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N., and Caboche, M.** (2006). Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**, 405-430.
- Lesnick, M.L., and Chandler, V.L.** (1998). Activation of the maize anthocyanin gene *a2* is mediated by an element conserved in many anthocyanin promoters. *Plant Physiol.* **117**, 437-445.
- Li, J., Ou-Lee, T.M., Raba, R., Amundson, R.G., and Last, R.L.** (1993 a). *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* **5**, 171-179.
- Li, B.Q., Fu, T., Yan, Y.D., Baylor, N.W., Ruscetti, F.W., and Kung, H.F.** (1993 b). Inhibition of HIV infection by baicalin - A flavonoid compound purified from Chinese herbal medicine. *Cell Mol. Biol. Res.* **39**, 119-124.
- Li, B.Q., Fu, T., Dongyan, Y., Mikovits, J.A., Ruscetti, F.W., and Wang, J.M.** (2000). Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 534-538.
- Liljgren, S.J., Roeder, A.H.K., Kempin, S., Gremski, K., Ostergaard, L., Guimil, S., Reyes, D.K., and Yanofsky, M.F.** (2004). Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by INDEHISCENT. *Cell* **116**, 843-853.
- Lima, P.T., Faria, V.G., Patraquim, P., Ramos, A.C., Feijo, J.A., and Sucena, E.** (2009). Plant-Microbe symbioses: new insights into common roots. *Bioessays* **31**, 1233-1244.
- Lippi, G., Franchini, M., Favaloro, E.J., and Targher, G.** (2010). Moderate red wine consumption and cardiovascular disease risk: beyond the "French paradox". *Semin. Thromb. Hemost.* **36**, 59-70.
- Liu, C.J., Blount, J.W., Steele, C.L., and Dixon, R.A.** (2002). Bottlenecks for metabolic engineering of isoflavone glycoconjugates in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14578-14583.
- Lloyd, A.M., Walbot, V., and Davis, R.W.** (1992). *Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators *R* and *C1*. *Science* **258**, 1773-1775.

- Lloyd, A.M., Schena, M., Walbot, V., and Davis, R.W.** (1994). Epidermal cell fate determination in *Arabidopsis*: patterns defined by a steroid-inducible regulator. *Science* **266**, 436-439.
- Luceri, C., Giovannelli, L., Pitozzi, V., Toti, S., Castagnini, C., Routaboul, J.M., Lepiniec, L., Larrosa, M., and Dolara, P.** (2008). Liver and colon DNA oxidative damage and gene expression profiles of rat fed *Arabidopsis thaliana* mutant seeds containing concentrated flavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 1213-1220.
- Magori, S., and Kawaguchi, M.** (2009). Long-distance control of nodulation: molecules and models. *Mol. Cells* **27**, 129-134.
- Marinova, K., Pourcel, L., Weder, B., Schwartz, M., Barron, D., Routaboul, J.M., Debeaujon, I., and Klein, M.** (2007). The *Arabidopsis* MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺ antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. *Plant Cell* **19**, 2023-2038.
- Marles, M.A., Gruber, M.Y., Scoles, G.J., and Muir, A.D.** (2003 a). Pigmentation in the developing seed coat and seedling leaves of *Brassica carinata* is controlled at the *dihydroflavonol reductase* locus. *Phytochemistry* **62**, 663-672.
- Marles, S.M.A., Ray, H., and Gruber, M.Y.** (2003 b). New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry* **64**, 367-383.
- Marles, S.M.A., and Gruber, M.Y.** (2004). Histochemical characterisation of unextractable seed coat pigments and quantification of extractable lignin in the Brassicaceae. *J. Sci. Food Agric.* **84**, 251-262.
- Marrs, K.A., Alfenito, M.R., Lloyd, A.M., and Walbot, V.** (1995). A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* **375**, 397-400.
- Martin, C., Prescott, A., Mackay, S., Bartlett, J., and Vrijlandt, E.** (1991). Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J.* **1**, 37-49.
- Massari, M.E., and Murre, C.** (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell Biol.* **20**, 429-440.
- Mathews, H., Clendennen, S.K., Caldwell, C.G., Liu, X.L., Connors, K., Matheis, N., Schuster, D.K., Menasco, D.J., Wagoner, W., Lightner, J., and Wagner, D.R.** (2003). Activation tagging in tomato identifies a transcriptional regulator of anthocyanin biosynthesis, modification, and transport. *Plant Cell* **15**, 1689-1703.
- Matsui, K., Umemura, Y., and Ohme-Takagi, M.** (2008). AtMYBL2, a protein with a single-MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* **55**, 954-967.
- Metzlaff, M., O'Dell, M., Cluster, P.D., and Flavell, R.B.** (1997). RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia. *Cell* **88**, 845-854.
- Meyer, P., Heidmann, I., Forkmann, G., and Saedler, H.** (1987). A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* **330**, 677-678.
- Mo, Y., Nagel, C., and Taylor, L.P.** (1992). Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7213-7217.

- Mol, J.N.M., Grotewold, E., and Koes, R.E.** (1998). How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci.* **3**, 212-217.
- Mooney, M., Desnos, T., Harrison, K., Jones, J., Carpenter, R., and Coen, E.** (1995). Altered regulation of tomato and tobacco pigmentation genes caused by the *delila* gene of *Antirrhinum*. *Plant J.* **7**, 333-339.
- Moyano, E., Martinez-Garcia, J.F., and Martin, C.** (1996). Apparent redundancy in myb gene function provides gearing for the control of flavonoid biosynthesis in antirrhinum flowers. *Plant Cell* **8**, 1519-1532.
- Mueller, L.A., and Walbot, V.** (2001). Models for vacuolar sequestration of anthocyanins. *Recent Adv. Phytochem.* **35**, 297-312.
- Murphy, A., Peer, W.A., and Taiz, L.** (2000). Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* **211**, 315-324.
- Naczk, M., Amarowicz, R., Sullivan, A., and Shahidi, F.** (1998). Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. *Food Chem.* **62**, 489-502.
- Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T., and Benfey, P.N.** (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* **413**, 307-311.
- Nakamura, S., Lynch, T.J., and Finkelstein, R.R.** (2001). Physical interactions between ABA response loci of *Arabidopsis*. *Plant J.* **26**, 627-635.
- Nemeth, K., Salchert, K., Putnoky, P., Bhalerao, R., Koncz-Kalman, Z., Stankovic-Stangeland, B., Bako, L., Mathur, J., Okresz, L., Stabel, S., Geigenberger, P., Stitt, M., Redei, G.P., Schell, J., and Koncz, C.** (1998). Pleiotropic control of glucose and hormone responses by PRL1, a nuclear WD protein, in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **12**, 3059-3073.
- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Pelletier, G., Caboche, M., and Lepiniec, L.** (2000). The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis* siliques. *Plant Cell* **12**, 1863-1878.
- Nesi, N., Jond, C., Debeaujon, I., Caboche, M., and Lepiniec, L.** (2001). The *Arabidopsis TT2* gene encodes an R2R3-MYB domain protein that acts as a key determinant for proanthocyanidin accumulation in developing seed. *Plant Cell* **13**, 2099-2114.
- Nesi, N.** (2001). Analyse génétique et moléculaire du métabolisme des flavonoïdes de la graine d'*Arabidopsis thaliana*. Thèse, INAP-G, pp. 167.
- Nesi, N., Debeaujon, I., Jond, C., Stewart, A.J., Jenkins, G.I., Caboche, M., and Lepiniec, L.** (2002). The *TRANSPARENT TESTA16* locus encodes the ARABIDOPSIS BSISTER MADS domain protein and is required for proper development and pigmentation of the seed coat. *Plant Cell* **14**, 2463-2479.
- Newman, L.J., Perazza, D.E., Juda, L., and Campbell, M.M.** (2004). Involvement of the R2R3-MYB, AtMYB61, in the ectopic lignification and dark-photomorphogenic components of the *det3* mutant phenotype. *Plant J.* **37**, 239-250.
- Ni, M., Tepperman, J.M., and Quail, P.H.** (1998). PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell* **95**, 657-667.

- Oppenheimer, D.G., Herman, P.L., Sivakumaran, S., Esch, J., and Marks, M.D.** (1991). A myb gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. *Cell* **67**, 483-493.
- Ovadi, J., and Srere, P.A.** (2000). Macromolecular compartmentation and channeling. *Int. Rev. Cytol.* **192**, 255-280.
- Parcy, F., Valon, C., Raynal, M., Gaubier-Comella, P., Delseny, M., and Giraudat, J.** (1994). Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed development: roles of the *ABI3* locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell* **6**, 1567-1582.
- Payne, C.T., Zhang, F., and Lloyd, A.M.** (2000). *GL3* encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with *GL1* and *TTG1*. *Genetics* **156**, 1349-1362.
- Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P.A., and Saedler, H.** (1987). The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. *Embo J.* **6**, 3553-3558.
- Peer, W.A., and Murphy, A.S.** (2007). Flavonoids and auxin transports: modulators or regulators? *Trends Plant Sci.* **12**, 556-563.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E., and Yanofsky, M.F.** (2000). B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. *Nature* **405**, 200-203.
- Penfield, S., Meissner, R.C., Shoue, D.A., Carpita, N.C., and Bevan, M.W.** (2001). MYB61 is required for mucilage deposition and extrusion in the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell* **13**, 2777-2791.
- Peters, N.K., Frost, J.W., and Long, S.R.** (1986). A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* **233**, 977-980.
- Pourcel, L., Routaboul, J.M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L., and Debeaujon, I.** (2005). TRANSPARENT TESTA 10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell* **11**, 2966-2980.
- Quattrocchio, F., Wing, J.F., Leppen, H., Mol, J., and Koes, R.E.** (1993). Regulatory genes controlling anthocyanin pigmentation are functionally conserved among plant species and have distinct sets of target genes. *Plant Cell* **5**, 1497-1512.
- Quattrocchio, F., Wing, J.F., van der Woude, K., Mol, J.N., and Koes, R.** (1998). Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. *Plant J.* **13**, 475-488.
- Quattrocchio, F., Baudry, A., Lepiniec, L., and Grotewold, E.** (2006). The regulation of flavonoid biosynthesis. In: *The science of flavonoids*, (Grotewold, E., eds). Springer science and business media, New-York, pp. 97-122.
- Que, Q., Wang, H.Y., English, J.J., and Jorgensen, R.A.** (1997). The frequency and degree of cosuppression by sense chalcone synthase transgenes are dependent on transgene promoter strength and are reduced by premature nonsense codons in the transgene coding sequence. *Plant Cell* **9**, 1357-1368.
- Radicella, J.P., Turks, D., and Chandler, V.** (2001). The MYB11 gene is required for flavonoid biosynthesis in the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Cell* **13**, 2793-2803.

- V.L.** (1991). Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding B-Peru, a regulatory protein of the anthocyanin pathway in maize. *Plant Mol. Biol.* **17**, 127-130.
- Rajani, S., and Sundaresan, V.** (2001). The *Arabidopsis* myc/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Curr. Biol.* **11**, 1914-1922.
- Rajjou, L. and Debeaujon, I.** (2008). Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *C.R. Biol* **331**, 796-805.
- Redmond, J.W., Batley, M., Djordjevic, M.A., Innes, R.W., Kuempel, P.L., and Rolfe, B.G.** (1986). Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* **323**, 632-634.
- Renaud, S., and de Lorgeril, M.** (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339**, 1523-1526.
- Rice-Evans, C., Miller, J.M., and Paganga, G.** (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **2**, 152-159.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K., and Yu, G.** (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**, 2105-2110.
- Riechmann, J.L.** (2002). Transcriptional regulation: a genomic overview. In *The Arabidopsis Book*, C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, eds (Rockville, American Society of Plant Biologists).
- Robbins, M.P., Paolocci, F., Hughes, J.W., Turchetti, V., Allison, G., Arcioni, S., Morris, P., and Damiani, F.** (2003). *Sn*, a maize bHLH gene, modulates anthocyanin and condensed tannin pathways in *Lotus corniculatus*. *J. Exp. Bot.* **54**, 239-248.
- Rosinski, J.A., and Atchley, W.R.** (1998). Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin. *J. Mol. Evol.* **46**, 74-83.
- Ross, J.A., and Kasum, C.M.** (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 19-34.
- Rugner, A., Frohnmeyer, H., Nake, C., Wellmer, F., Kircher, S., Schafer, E., and Harter, K.** (2001). Isolation and characterization of four novel parsley proteins that interact with the transcriptional regulators CPRF1 and CPRF2. *Mol. Genet. Genomics* **265**, 964-976.
- Sagasser, M., Lu, G.H., Hahlbrock, K., and Weisshaar, B.** (2002). *A. thaliana* *TRANSPARENT TESTA1* is involved in seed coat development and defines the WIP subfamily of plant zinc finger proteins. *Genes Dev.* **16**, 138-149.
- Sainz, M.B., Grotewold, E., and Chandler, V.L.** (1997). Evidence for direct activation of an anthocyanin promoter by the maize C1 protein and comparison of DNA binding by related Myb domain proteins. *Plant Cell* **9**, 611-625.
- Salghetti, S.E., Caudy, A.A., Chenoweth, J.G., and Tansey, W.P.** (2001). Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* **293**, 1651-1653.
- Santos-Buelga, C., and Scalber, A.**

- (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake, and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1094-1117.
- Sawa, S.** (2002). Overexpression of the *AtmybL2* gene represses trichome development in *Arabidopsis*. *DNA Res.* **9**, 31-34.
- Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carre, I.A., and Coupland, G.** (1998). The *late elongated hypocotyl* mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering. *Cell* **93**, 1219-1229.
- Schellmann, S., Schnittger, A., Kirik, V., Wada, T., Okada, K., Beermann, A., Thumfahrt, J., Jurgens, G., and Hulskamp, M.** (2002). TRIPTYCHON and CAPRICE mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis*. *Embo J.* **21**, 5036-5046.
- Schillmiller, A.L., Last, R.L., and Pichersky, E.** (2008). Harnessing plant trichome biochemistry for the production of useful compounds. *Plant J.* **54**, 702-711.
- Schoenbohm, C., Martens, S., Eder, C., Forkmann, G., and Weisshaar, B.** (2000). Identification of the *Arabidopsis thaliana* flavonoid 3'-hydroxylase gene and functional expression of the encoded P450 enzyme. *Biol. Chem.* **381**, 749-753.
- Schultze, M., and Kondorosi, A.** (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 33-57.
- Seo, H.S., Yang, J.Y., Ishikawa, M., Bolle, C., Ballesteros, M.L., and Chua, N.H.** (2003). LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* **423**, 995-999.
- Shikazono, N., Yokota, Y., Kitamura, S., Suzuki, C., Watanabe, H., Tano, S., and Tanaka, A.** (2003). Mutation rate and novel *tt* mutants of *Arabidopsis thaliana* induced by carbon ions. *Genetics* **163**, 1449-1455.
- Shin, B., Choi, G., Yi, H., Yang, S., Cho, I., Kim, J., Lee, S., Paek, N.C., Kim, J.H., and Song, P.S.** (2002). *AtMYB21*, a gene encoding a flower-specific transcription factor, is regulated by COP1. *Plant J.* **30**, 23-32.
- Shirley, B.W., Hanley, S., and Goodman, H.M.** (1992). Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis transparent testa* mutations. *Plant Cell* **4**, 333-347.
- Shirley, B.W., Kubasek, W.L., Storz, G., Bruggemann, E., Koornneef, M., Ausubel, F., and Goodman, H.M.** (1995). Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *Plant J.* **8**, 659-671.
- Singh, K.B.** (1998). Transcriptional regulation in plants: the importance of combinatorial control. *Plant Physiol.* **118**, 1111-1120.
- Smalle, J., and Vierstra, R.D.** (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**, 555-590.
- Smolen, G.A., Pawlowski, L., Wilensky, S.E., and Bender, J.** (2002). Dominant alleles of the basic helix-loop-helix transcription factor ATR2 activate stress-responsive genes in *Arabidopsis*. *Genetics* **161**, 1235-1246.
- Sompornpailin, K., Makita, Y., Yamazaki, M., and Saito, K.** (2002). A WD-repeat-containing putative regulatory protein in anthocyanin

- biosynthesis in *Perilla frutescens*. *Plant Mol. Biol.* **50**, 485-495.
- Sorensen, A.M., Krober, S., Unte, U.S., Huijser, P., Dekker, K., and Saedler, H.** (2003). The *Arabidopsis* *ABORTED MICROSPORES (AMS)* gene encodes a MYC class transcription factor. *Plant J.* **33**, 413-423.
- Spelt, C., Quattrocchio, F., Mol, J.N., and Koes, R.** (2000). *anthocyanin1* of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes. *Plant Cell* **12**, 1619-1632.
- Sprenger-Haussels, M., and Weisshaar, B.** (2000). Transactivation properties of parsley proline-rich bZIP transcription factors. *Plant J.* **22**, 1-8.
- Stafford, H.** (1990). Flavonoid metabolism, H. Stafford, ed (Boca Raton: CRC Press).
- Steiner-Lange, S., Unte, U.S., Eckstein, L., Yang, C., Wilson, Z.A., Schmelzer, E., Dekker, K., and Saedler, H.** (2003). Disruption of *Arabidopsis thaliana* *MYB26* results in male sterility due to non-dehiscent anthers. *Plant J* **34**, 519-528.
- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B.** (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**, 447-456.
- Sundqvist, A., and Ericsson, J.** (2003). Transcription-dependent degradation controls the stability of the SREBP family of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 13833-13838.
- Suzuki, M., Kao, C.Y., and McCarty, D.R.** (1997). The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity. *Plant Cell* **9**, 799-807.
- Suzuki, M., Kao, C.Y., Cocciolone, S., and McCarty, D.R.** (2001). Maize *VP1* complements *Arabidopsis abi3* and confers a novel ABA/auxin interaction in roots. *Plant J.* **28**, 409-418.
- Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culianez-Macia, F.A., Roberts, K., and Martin, C.** (1998). The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *Antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco. *Plant Cell* **10**, 135-154.
- Tanner, G.J., Francki, K.T., Abrahams, S., Watson, J.M., Larkin, P.J., and Ashton, A.R.** (2003). Proanthocyanidin biosynthesis in plants. Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA. *J. Biol. Chem.* **278**, 31647-31656.
- Tansey, W.P.** (2001). Transcriptional activation: risky business. *Genes Dev.* **15**, 1045-1050.
- Taylor, L.P., and Jorgensen, R.A.** (1992). Conditional male fertility in chalcone synthase-deficient petunia. *J. Hered.* **83**, 11-17.
- Thomas, D., and Tyers, M.** (2000). Transcriptional regulation: Kamikaze activators. *Curr. Biol.* **10**, R341-343.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., and Quail, P.H.** (2003). The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* **15**, 1749-1770.
- Uno, T., and Yasui-Furukori, N.** (2006). Effect of grapefruit juice in relation to human pharmacokinetic studies. *Curr Clin Pharmacol* **2**, 157-161.
- Vailleau, F., Daniel, X., Tronchet, M., Montillet, J.L., Triantaphylides, C., and Roby, D.** (2002). A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive

- regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 10179-10184.
- Van Nocker, S., and Ludwig, P.** (2003). The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function. *BMC Genomics* **4**:50.
- Vicente-Carbajosa, J., Moose, S.P., Parsons, R.L., and Schmidt, R.J.** (1997). A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7685-7690.
- Vidavalur, R., Otani, H., Singal, P.K., and Maulik, N.** (2006). Significance of wine and resveratrol in cardiovascular disease: French paradox revisited. *Exp. Clin. Cardiol.* **11**: 217-225.
- Vogt, T., and Taylor, L.P.** (1995). Flavonol 3-O-glycosyltransferases associated with petunia pollen produce gametophyte-specific flavonol diglycosides. *Plant Physiol.* **108**, 903-911.
- Vom Endt, D., Kijne, J.W., and Memelink, J.** (2002). Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? *Phytochemistry* **61**, 107-114.
- Wada, T., Tachibana, T., Shimura, Y., and Okada, K.** (1997). Epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* determined by a Myb homolog, CPC. *Science* **277**, 1113-1116.
- Wade, H.K., Sohal, A.K., and Jenkins, G.I.** (2003). *Arabidopsis* ICX1 is a negative regulator of several pathways regulating flavonoid biosynthesis genes. *Plant Physiol.* **131**, 707-715.
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P., and Mauch, F.** (2002). Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol. Biol.* **49**, 515-532.
- Walker, A.R., Davison, P.A., Bolognesi-Winfield, A.C., James, C.M., Srinivasan, N., Blundell, T.L., Esch, J.J., Marks, M.D., and Gray, J.C.** (1999). The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell* **11**, 1337-1350.
- Wang, H., Tang, W., Zhu, C., and Perry, S.E.** (2002). A chromatin immunoprecipitation (ChIP) approach to isolate genes regulated by AGL15, a MADS domain protein that preferentially accumulates in embryos. *Plant J* **32**, 831-843.
- Wang, Q., Wang, H., and Xie, M.** (2010). Antibacterial mechanism of soybean isoflavone on *Staphylococcus aureus*. *Arch. Microbiol.* Epub ahead of print.
- Wang, Z.Y., Kenigsbuch, D., Sun, L., Harel, E., Ong, M.S., and Tobin, E.M.** (1997). A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis* *Lhcb* gene. *Plant Cell* **9**, 491-507.
- Western, T.L., Young, D.S., Dean, G.H., Tan, W.L., Samuels, A.L., and Haughn, G.W.** (2004). *MUCILAGE-MODIFIED4* encodes a putative pectin biosynthetic enzyme developmentally regulated by *APETALA2*, *TRANSPARENT TESTA GLABRA1*, and *GLABRA2* in the *Arabidopsis* seed coat. *Plant Physiol.* **134**, 296-306.
- William, D.A., Su, Y., Smith, M.R., Lu, M., Baldwin, D.A., and Wagner, D.** (2004). Genomic identification of direct

- target genes of LEAFY. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**, 1775-1780.
- Winkel, B.S.J.** (2004). Metabolic channeling in plants. Annu. Rev. Plant Biol. **55**, 85-107.
- Winkel-Shirley, B.** (1998). Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. Seed Sci. Res. **8**, 415-422.
- Winkel-Shirley, B.** (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. Plant Physiol. **126**, 485-493.
- Winkel-Shirley, B.** (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Curr. Opin. Plant Biol. **5**, 218-223.
- Wisman, E., Hartmann, U., Sagasser, M., Baumann, E., Palme, K., Hahlbrock, K., Saedler, H., and Weisshaar, B.** (1998). Knock-out mutants from an *En-1* mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 12432-12437.
- Wu, X., Weigel, D., and Wigge, P.A.** (2002). Signaling in plants by intercellular RNA and protein movement. Genes Dev. **16**, 151-158.
- Xie, D.Y., Sharma, S.B., Paiva, N.L., Ferreira, D., and Dixon, R.A.** (2003). Role of anthocyanidin reductase, encoded by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis. Science **299**, 396-399.
- Xie, D.Y., Sharma, S.B., and Dixon, R.A.** (2004). Anthocyanidin reductases from *Medicago truncatula* and *Arabidopsis thaliana*. Arch. Biochem. Biophys. **422**, 91-102.
- Yalovsky, S., Rodriguez-Concepcion, M., Bracha, K., Toledo-Ortiz, G., and Gruissem, W.** (2000). Prenylation of the floral transcription factor APETALA1 modulates its function. Plant Cell **12**, 1257-1266.
- Yamashino, T., Matsushika, A., Fujimori, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Mizuno, T.** (2003). A link between circadian-controlled bHLH factors and the APRR1/TOC1 quintet in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. **44**, 619-629.
- Zhang, F., Gonzalez, A., Zhao, M., Payne, C.T., and Lloyd, A.** (2003). A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis*. Development **130**, 4859-4869.
- Zhao, J., and Dixon, R.A.** (2009). MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. Plant Cell **21**, 2323-2340.

Nom - Prénoms : BAUDRY Antoine Sébastien

Titre de la thèse :

La régulation du Métabolisme Secondaire chez les Plantes :
Exemple de la Biosynthèse des Flavonoïdes.

Résumé de la thèse :

L'objet de ce manuscrit de thèse est de constituer une synthèse bibliographique de l'état des connaissances actuelles sur la biosynthèse des flavonoïdes en détaillant les différentes étapes enzymatiques mais surtout en s'attachant à décrire les avancées récentes dans la compréhension des mécanismes de régulation génétique de ces enzymes. Tout d'abord, les composés flavonoïques, leur structure, leur fonction présumée chez les végétaux et leur importance en nutrition humaine et animale sont présentées. Puis un intérêt particulier est apporté à la plante modèle *Arabidopsis thaliana* pour laquelle de nombreuses données génétiques et biochimiques sont disponibles, concernant notamment la biosynthèse d'une classe particulière de flavonoïdes : les proanthocyanidines (PA). Ces composés sont accumulés dans les téguments de la graine d'*A. thaliana* et ont fait l'objet d'études lors d'un travail de recherche effectué dans le laboratoire de Biologie des Semences du centre INRA de Versailles (A. Baudry, Thèse de doctorat en Sciences, 2004). Après une présentation des principales classes de protéines régulatrices des PA : MYB, bHLH et à domaine WDR, des résultats concernant le mode d'action de plusieurs de ces protéines sont présentés sous la forme de trois publications scientifiques. Une première publication (Baudry *et al.*, 2004) décrit la formation d'un complexe de facteurs de transcription entre les régulateurs TT2 (MYB), TT8 (bHLH) et TTG1 (WDR) et l'importance de ce complexe pour l'activation des enzymes de biosynthèse, notamment *BANYULS*. Les mécanismes de régulation de *TT8* et l'existence d'une boucle d'auto-régulation amplifiant l'expression de ce gène sont décrits dans une seconde publication (Baudry *et al.*, 2006). Enfin, les résultats obtenus pour la caractérisation d'un régulateur négatif de la biosynthèse des flavonoïdes sont présentés dans une troisième publication (MYBL2 ; Dubos *et al.*, 2008).

MOTS CLES : FLAVONOÏDES, PROANTHOCYANIDINES, ARABIDOPSIS

JURY :

Président : M. Yves-François POUCHUS, Professeur de Botanique et Cryptogamie,
Faculté de Pharmacie de Nantes
Assesseurs : M. Jean-François BIARD, Professeur de Physiologie Végétale et
Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie de Nantes
M. Thomas DEJOIE, Praticien Hospitalier, Service de Biochimie,
CHU de Nantes
