



**HAL**  
open science

# Développement d'outils moléculaires et cellulaires pour générer des variétés de Pomelo “ Star Ruby ” ne produisant pas de Furocoumarines

Mariana Cecilia Limones Méndez

► **To cite this version:**

Mariana Cecilia Limones Méndez. Développement d'outils moléculaires et cellulaires pour générer des variétés de Pomelo “ Star Ruby ” ne produisant pas de Furocoumarines. Agronomie. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0045 . tel-02347896

**HAL Id: tel-02347896**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02347896v1>**

Submitted on 8 Jun 2021

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

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ DE LORRAINE

École doctorale Science et Ingénierie des Ressources Naturelles

**Développement d'outils moléculaires et cellulaires  
pour générer des variétés de Pomelo « Star Ruby » ne  
produisant pas de Furocoumarines**

**THÈSE**

Présentée et soutenue publiquement le 4 juin 2019  
pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université de Lorraine en**

**SCIENCES AGRONOMIQUES**

par

**Mariana Cecilia LIMONES MÉNDEZ**

**Composition du jury**

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Rapporteurs :           | Mme Caroline RAMBAUD, MCF (HDR), Université de Lille<br>M. Nicolas NAVROT, MCF (HDR), IBMP Strasbourg    |
| Examinatrices :         | Mme Mélanie MOREL-ROUHIER, PR, Université de Lorraine<br>Mme Nathalie GUIVARC'H, PR, Université de Tours |
| Directeur de Thèse :    | M. Alain HEHN, PR, Université de Lorraine  |
| Co-directeur de Thèse : | M. Alexandre OLRYS, IR (ACT), Université de Lorraine   |
| Invité :                | M. Frédéric BOURGAUD, PR en disponibilité, Université de Lorraine  |



À mes parents  
*A mis papás*



## **Remerciements**

Cette thèse n'est pas le travail d'une thésarde seule, mais le reflet du soutien que j'ai reçu de différentes personnes et de la contribution de différents organismes, que je souhaite remercier dans les lignes suivantes :

Tout d'abord, je souhaite remercier le Conseil National de la Science et de la Technologie du Mexique, qui m'a donné une bourse pour poursuivre mes études de master en France et une prolongation pour pouvoir continuer mon doctorat. Je tiens également à remercier la SATT SAYENS d'avoir financé le projet NoFuroc, qui couvrait les dépenses de recherche de mon projet de thèse, et Aude Hyardin pour son suivi lors de la maturation du projet.

Je remercie Alain Hehn, mon directeur de thèse, de m'avoir donné sa confiance pour ce sujet de recherche depuis mon stage de master. Merci pour l'autonomie qu'il m'a laissée pour mener ce projet, mais également pour l'encadrement et la bienveillance qu'il a eu au cours de ces années, ainsi que pour les nombreuses corrections et le temps de relectures qu'il a investi dans ce manuscrit. Être loin de mes proches n'a pas été facile. Je suis donc profondément reconnaissante de son empathie envers moi et ma famille pendant les moments difficiles que nous avons heureusement surmontés.

Je remercie également Alexandre Olry, mon co-directeur de thèse, qui a lui aussi été d'un grand soutien ces années. Merci pour son aide avec mes expériences, mes multiples interrogations au quotidien dans le laboratoire et pour le travail investi dans ce manuscrit. Merci aussi pour la bonne humeur, les pauses café, les chocolats et la mirabelle de sa propre récolte.

Lors de mon passage par le Laboratoire d'Agronomie et Environnement, il y a eu transition entre les directeurs de l'unité. Merci à Frédéric Bourgaud et Christophe Robin, qui m'ont permis de faire partie de l'équipe. Je suis très reconnaissante envers Frédéric, qui a été aussi mon directeur de thèse pendant la première année, pour tous ses enseignements et participation à mes comités de thèse, même après être parti du laboratoire. Merci également à Christophe pour son implication dans la formation des doctorants au laboratoire et de nous avoir aidé à nous approprier notre sujet de thèse.

Merci à Romain Larbat, animateur de l'équipe Métabolisme Secondaire, pour son intérêt dans ma recherche et les multiples discussions que nous avons eues lorsque je me sentais coincée dans le projet. Merci aussi pour sa bonne humeur, très compatible avec mon humour sarcastique, et pour son goût prononcé pour mes choco-flans. Je lui promets qu'il y en aura un lors de mon pot de thèse.

A Dominique Dambier que je remercie de m'avoir transmis ses compétences et connaissances sur les agrumes et la manipulation de protoplastes lors de mon bref séjour au Cirad

à Montpellier, ainsi que lors des échanges téléphoniques depuis Nancy. Merci également à Fabien Nogué pour son soutien dans la mise en œuvre de notre stratégie CRISPR / Cas9.

Je remercie Danielle Werck et Nicolas Rouhier d'avoir été un grand pilier dans la formation de ce projet de doctorat, pour tout le temps investi lors des comités de pilotage de thèse de chaque année. Cela m'a permis d'enrichir énormément mes expériences et résultats en prenant en compte une perspective extérieure au projet, ainsi que ma vision de la poursuite d'une carrière dans la recherche. Merci à Caroline Rambaud et Nicolas Navrot d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et à Mélanie Morel-Rouhier et Nathalie Guivarc'h d'avoir accepté d'être examinatrices.

Je remercie l'équipe INRA / CIRAD de San Giuliano en Corse et le Jardin botanique de Villiers pour les échantillons d'agrumes.

Merci aussi à Audray Dugrand-Judek, pour son aide quand je commençais la thèse et qu'elle finissait la sienne. Elle m'a passé le relais d'un sujet de recherche passionnant : le métabolisme secondaire chez les agrumes. J'espère que nous travaillerons à nouveau ensemble un jour.

Entre 2017 et 2018, j'ai compté sur le soutien technique de Yuka Munakata. Je lui suis énormément reconnaissante pour tout son travail dans la préparation et la transformation des protoplastes, ainsi que pour la gentillesse dont elle fait preuve tous les jours. Elle est également devenue une grande amie. Sans Yuka, je n'aurais pas pu faire tout ce travail. どうもありがとう.

Je remercie également le reste de l'équipe technique du laboratoire, en commençant par Clément Charles, qui m'a aussi beaucoup aidé pendant ce temps. Il a certainement « la main verte » pour le clonage de séquences d'ADN ! Merci à Aude de répondre à toutes mes questions d'hygiène et de sécurité et son aide dans certains accidents (oups) ; et à Jérémy pour toute son aide concernant les questions de chromatographie. Merci également à Julie qui a passé des nombreuses commandes pour mes expériences à Claude pour tout le travail qu'il fait dans le laboratoire.

En plus de l'équipe technique, je remercie également mes anciens et nouveaux collègues de laboratoire : Andreïna, Caroline, Chloé, Colin, Gianni, Jérémie, Julie, Ludivine, Marwa, Ryosuke et Sandro, pour les échanges que j'ai eu pendant ces dernières années. Merci spécialement à Ryosuke pour toutes ses bonnes idées et pour répondre à mes nombreuses questions de recherche.

Au laboratoire, nous sommes également enrichis d'une collaboration quotidienne avec PAT. Merci beaucoup à Carole, Sissi et Estelle pour toute leur aide et leur intérêt pour les questions de biologie moléculaire, d'expression de protéines hétérologues et de culture *in vitro* de mon projet. Votre expérience et vos connaissances ont sauvé plus d'une fois mes expériences ! Merci également à Cindy d'aider à garder le laboratoire en ordre et de m'avoir dépanné assez souvent !

En plus des contacts professionnels et scientifiques, j'ai connu le côté humain et social de mes collègues du laboratoire. Ça n'aurait pas pu être mieux ! Nous avons eu toutes sortes d'activités,

telles que la recherche de Duckie, qui d'ailleurs, s'est caché quelques semaines au Mexique ; les raclettes à midi, dont l'odeur restait pendant trois jours dans les couloirs ; la Fête de la soupe ; les concours de cookies, crêpes, etc. ; les galettes de rois pendant deux semaines d'affilée ; el Día de Muertos ; les célébrations des anniversaires, les pots des thèses et des départs... Avec tout cela, ils sont tous devenus une partie très importante de ma vie à Nancy. Merci à eux pour leur implication dans la vie du laboratoire !

Tout au long des différentes étapes de ma courte vie (de presque 30 ans), j'ai rencontré des amis qui sont devenus ma famille. Mes années en France ne sont pas une exception et j'ai rencontré des personnes qui ont fait de ça une expérience profondément enrichissante et ont surtout fait grandir mon cœur pour leur faire de la place.

Merci à Gianni, Caro, Colin, Justine, Clément, Jérémy, David, Yuka et Ryosuke, qui ont été mes grands amis dedans et dehors le laboratoire, entre quelques réunions « secrètes » après les repas pour jouer au Dobble, les soirées raclette, les bières, les pizzas chèvre-miel, les anniversaires, les séances de Game of Thrones, le voyage à Chamonix et quelques aventures à la Plantation... Caro, merci d'avoir tout commencé ! Gigi, j'ai eu de la chance de pouvoir partager toutes les étapes de la thèse avec toi. Merci pour ta patience, ton écoute et tout ce qu'on a rigolé ! T'es vraiment le meilleur ami !

Je me sens une vraie nancéienne maintenant après plus de 5 ans et demi de vie dans cette belle ville. Merci à Livia et à Chloé, mes premières amies de Nancy sur qui je sais que je peux toujours compter, et à leurs familles, les Réa et les Vallée, qui m'ont beaucoup aidée et bien accueillie dès le début. Merci pour tout les AT ☺. Je remercie aussi Julie François pour toute son aide dans différents domaines tels que la santé, la mode, le sport... et notamment de m'avoir motivée à faire les 10 km de la St. Nicolas !

Merci à Marie-France et Jean-Luc Banon pour toute leur gentillesse depuis que j'ai collaboré avec eux à l'AFDI. Merci également de m'avoir laissé écrire une petite partie de ce manuscrit dans votre maison à Punerot, ce week-end-là m'a fait du bien !

Je remercie mes amis de loin, mais qui envoient toujours leur soutien et qui ne m'oublient pas, je ne vous oublie pas non plus. Merci à Eva Feliz, toujours disponible à n'importe quelle heure (merci d'ailleurs à WhatsApp) ; à Gaby Sánchez, Tenshi, Miguel, Tita et Joshua le moche. Merci à mes copines du lycée avec qui, après tout ce temps (et distance), nous sommes toujours amies : Dany, Luly, Ruth et Ximena.

Merci à Lala pour sa précieuse amitié depuis aussi longtemps. Merci également à ses parents, Lorena et Rodolfo pour tout leur soutien et affection.

A la communauté des mexicains / latinos de Nancy, merci pour tout ! Compadrito Aramís, Arlen, Marc-Anthoine, Ronay, Rosy, Albert, Jinmi, Karen, Robert, Eber, Pili, Anne-Claire, Leslye,

Estibaly, Mariana, Tibo, Meli, Cristy, Claudia, Ale, Alexis, Mariana, Aliz et tous ceux qui ont participé à l'organisation de "Por México". Je remercie particulièrement Dulce, pour son amitié et soutien pendant la fin de la thèse.

Merci également à Reyna et Humberto pour leurs conseils de vie (personnels et professionnels) et à Morris, car je « me suis adopté » chez eux.

À mes deux sœurs de Nancy (et de la recherche) : Carmen et Magali, qui ont été un pilier pour moi pendant ces trois dernières années, merci beaucoup. Carmenita, merci de partager en plus 6 mois en colocation « fragnolesque », je ne m'habitue toujours pas à ne pas te voir tous les jours ! tu vas me manquer à Prague.

Aux oncles et cousins Limones et Méndez Mota, que je ne peux pas nommer un par un car nous sommes déjà plus d'une centaine, mais j'apprécie leurs mots d'encouragement et d'affection venus de si loin. Surtout abuelito Lupe, abuelita Lola, abuelito Felipe et tío Chepo, qui sont partis avant que je puisse partager ce moment avec eux, mais je sais qu'ils m'accompagnent toujours.

Je suis très reconnaissant à Florence Hella pour son soutien et pour m'avoir reçue dans sa famille. J'apprécie tout ce qu'elle fait continuellement pour moi et je suis très heureuse de partager ce moment avec elle.

À ma famille pour son soutien inconditionnel : Iván et Iveth, Claudia et Poncho. Claudia, merci d'être aussi ma meilleure amie et le plus grand soutien que j'ai. À mes neveux qui sont les plus beaux du monde et qui apportent autant de joie à la vie : Andrés, Noel et Ana Isabel.

Merci à Jordan, pour tout son soutien et sa patience, pour avoir été présent lors des hauts et des bas de ma thèse, pour avoir répété mes exposés avec moi, pour avoir corrigé mes rapports et m'avoir aidé à comprendre les bases de l'électrostatique (très utile pour la partie électroporation). Merci surtout d'être la grande personne qu'il est et que j'admire, qui m'enrichit quotidiennement, qui ne peut être un seul moment sans faire quelque chose de productif, qui nettoie et range tout ce qu'il trouve sur son chemin et avec qui je ris autant. J'espère un jour réussir à te payer tout ce que tu fais pour moi avec ce que tu aimes le plus au monde : la nourriture. Merci, mi Guapo.

Enfin, je tiens à remercier mes parents, avec qui je partage cette réussite. Je leur dois ce que je suis et jusqu'où je suis arrivée. C'est pourquoi je leur dédie cette thèse. Je les aime beaucoup et je reconnais tous les efforts et les sacrifices qu'ils ont fait pour nous donner le meilleur à mon frère, ma sœur et moi, y compris l'éducation. Voici le fruit de vos efforts. Merci pour tant d'amour et pour autant de travail.

**Merci à tous !**

# Sommaire

|   |      |
|---|------|
| REMERCIEMENTS.....  | I    |
| LISTE DE FIGURES.....   | IX   |
| LISTE DE TABLEAUX.....  | XI   |
| LISTE D'ANNEXES.....  | XII  |
| ABREVIATIONS.....   | XIII |
| ESPECES CITEES ET NOMS VERNACULAIRES.....   | II   |
| CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE ET PRÉSENTATION DES OBJECTIFS DE LA THÈSE.....  | 1    |
| 1. LES AGRUMES.....   | 1    |
| 1.1. <i>Présentation des agrumes</i> .....  | 1    |
| 1.2. <i>Le pomelo</i> .....   | 3    |
| 1.2.1. Propriétés anticancéreuses.....  | 4    |
| 1.2.2. Propriétés antioxydantes.....  | 4    |
| 1.2.3. Propriétés anti-inflammatoires.....  | 4    |
| 1.2.4. Propriétés anti-ostéoporose.....   | 5    |
| 1.2.5. L'effet pomelo.....  | 5    |
| 1.2.6. Pomelo et furocoumarines.....  | 6    |
| 1.3. <i>Importance économique des agrumes</i> .....   | 7    |
| 2. LA BIOSYNTHESE DES COUMARINES ET FUROCUMARINES.....  | 9    |
| 2.1. <i>Première étape : les coumarines</i> .....   | 9    |
| 2.2. <i>Vers les furocoumarines</i> .....   | 11   |
| 3. SÉLECTION ET AMÉLIORATION DES AGRUMES.....   | 14   |
| 3.1. <i>L'amélioration conventionnelle des agrumes et ses difficultés</i> .....   | 14   |
| 3.2. <i>La culture in vitro</i> .....   | 15   |
| 3.2.1. Hybridation somatique.....   | 16   |
| 3.3. <i>La transgénèse chez les agrumes</i> .....   | 17   |
| 3.3.1. Utilisation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....  | 17   |
| 3.3.2. Transformation de protoplastes.....  | 17   |
| 4. VERS L'ÉDITION DU GÈNOME DU POMELO.....  | 18   |
| 4.1. <i>L'édition de génome par des ciseaux moléculaires</i> .....  | 18   |
| 4.2. <i>CRISPR/Cas9 chez les agrumes</i> .....  | 20   |
| OBJECTIFS DE LA THÈSE.....  | 21   |
| CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION.....  | 25   |
| PARTIE 1 : CULTURE <i>IN VITRO</i> DE POMELO STAR RUBY.....   | 25   |
| 1. CULTURE <i>IN VITRO</i> ET PRÉPARATION DE PROTOPLASTES DE POMELO VARIÉTÉ <i>STAR RUBY</i> .....  | 25   |
| 1.1. <i>Cals embryogéniques de pomelo Star Ruby et isolement de protoplastes</i> .....  | 25   |
| 1.1.1. Culture de cals.....   | 25   |
| 1.1.2. Préparation de protoplastes.....   | 26   |
| 1.1.3. Culture cellulaire et production de protoplastes.....  | 27   |
| 2. TRANSFORMATION DE PROTOPLASTES DE POMELO STAR RUBY PAR UNE APPROCHE D'ÉLECTROPORATION.....   | 29   |
| 2.1. <i>Théorie de l'électroporation</i> .....  | 29   |
| 2.2. <i>Détermination théorique des conditions initiales : adaptation des conditions d'électroporation aux protoplastes de la variété Star Ruby</i> ..... | 30   |
| 2.3. <i>Amélioration des conditions d'électroporation de protoplastes</i> .....   | 31   |
| 2.3.1. Expression de la protéine DsRed.....   | 31   |
| 2.3.2. Temps caractéristique.....   | 33   |
| 2.3.3. Tension.....   | 34   |
| 2.3.4. Concentration de protoplastes.....   | 34   |
| 3. RÉGÉNÉRATION DE PLANTES À PARTIR DE PROTOPLASTES.....  | 35   |
| 3.1. <i>Protocole de régénération n°1 de Dominique Dambier</i> .....  | 36   |
| 3.2. <i>Protocole de régénération n° 2 de Omar et al. 2012</i> .....  | 37   |
| 3.3. <i>Protocole de régénération n° 3 adapté de Omar et al. 2012</i> .....   | 37   |

|  |   |           |
|--|---|-----------|
| 3.4.   | <i>Sélection des protoplastes transformés en régénération.</i>  | 39        |
| 4.   | DISCUSSION ET PERSPECTIVES  | 40        |
| <b>PARTIE 2 : STRATEGIE GENERALE CRISPR/CAS9 POUR INHIBER LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES FUROCOUMARINES CHEZ LE POMELO STAR RUBY</b> |   | <b>43</b> |
| 1.   | CARACTERISATION MOLECULAIRE DE GFPT1 (ORTHOLOGUE DE CpPT4) CHEZ LE POMELO STAR RUBY   | 44        |
| 1.1.   | <i>Expression de GfPT1</i>  | 44        |
| 1.2.   | <i>Clonage de la séquence codante de GfPT1</i>  | 45        |
| 1.3.   | <i>Analyse bio-informatique des séquences peptidiques</i>   | 46        |
| 1.3.1.   | Analyse de la structure génomique de la séquence codant pour GFPT1  | 47        |
| 2.   | MISE EN PLACE DE LA STRATEGIE CRISPR/CAS9 EN VUE D'INHIBER LA PRODUCTION DE FUROCOUMARINES  | 49        |
| 2.1.   | <i>Éléments de cadrage</i>  | 49        |
| 2.2.   | <i>Identification des séquences cibles</i>  | 50        |
| 2.3.   | <i>Construction des vecteurs CRISPR</i>   | 51        |
| 3.   | TRANSFORMATION GENETIQUE DE PROTOPLASTES DE POMELO STAR RUBY : CARACTERISATION MOLECULAIRE  | 52        |
| 4.   | DISCUSSION ET PERSPECTIVES  | 55        |
| <b>PARTIE 3 : RECHERCHE DES GENES CODANT POUR DES CYTOCHROMES P450 IMPLIQUES DANS LA VOIE DE BIOSYNTHESE DES FUROCOUMARINES.</b> |   | <b>57</b> |
| 1.   | RECHERCHE DE GENES CANDIDATS DANS LA FAMILLE CYP82  | 58        |
| 1.1.   | <i>Éléments de Contexte</i>   | 58        |
| 1.2.   | <i>Recherche de gènes candidats de la famille des CYP82 dans le génome annoté de Citrus clementina et Citrus paradisi dans la base de données Phytozome</i> | 58        |
| 1.3.   | <i>Recherche de gènes candidats de la famille des CYP82 par une approche d'analyse de banques RNAseq</i>  | 60        |
| 1.3.1.   | Banque de Voo <i>et al.</i> 2012  | 60        |
| 1.3.2.   | Banque de Ryosuke Munakata  | 61        |
| 1.4.   | <i>Organisation génomique des gènes codants pour les CYP82 chez les agrumes</i>   | 62        |
| 1.4.1.   | Vers une organisation en cluster ?  | 62        |
| 1.4.2.   | Structure génique des séquences candidates  | 64        |
| 1.5.   | <i>Analyse des séquences peptidiques</i>  | 65        |
| 1.5.1.   | Analyse phylogénétique de la famille des CYP82  | 65        |
| 2.1  | <i>Clonage des séquences codantes</i>   | 68        |
| 1.6.   | <i>Expression hétérologue des CYP82 clonés et criblages métaboliques</i>  | 70        |
| 1.6.1.   | Criblage fonctionnel  | 72        |
| 2.   | RECHERCHE D'AUTRES GENES CANDIDATS  | 74        |
| 2.1.   | <i>Éléments de contexte</i>   | 74        |
| 2.2.   | <i>Recherche de gènes candidats affiliés à la famille des CYP71 dans le génome annoté de C. clementina et C. paradisi dans la base de données Phytozome</i> | 74        |
| 2.3.   | <i>Recherche d'autres gènes candidats par un criblage transcriptomique</i>  | 75        |
| 2.4.   | <i>Clonage des séquences codantes</i>   | 76        |
| 2.4.1.   | Annotation des séquences clonées  | 77        |
| 2.5.   | <i>Expression de CYP71AN28 (Cit13) et CYP706J12 (Cit18) et criblages métaboliques</i>   | 78        |
| 2.5.1.   | Criblage fonctionnel par bioconversion  | 79        |
| 2.5.1.1.   | Amélioration de la méthode décrite par Lariat <i>et al</i> et preuve de concept avec CYP71AZ4   | 80        |
| 2.5.1.2.   | Test de tous les P450s candidats de la famille CYP82, CYP71AN28 et CYP706J12  | 81        |
| 3.   | DISCUSSION ET PERSPECTIVES  | 82        |
| 3.1.   | <i>Évolution convergente des CYP71 et CYP82</i>   | 82        |
| 3.2.   | <i>Identification d'un nouveau P450 impliqué dans la synthèse des coumarines chez les agrumes</i>   | 82        |
| <b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b>   |   | <b>87</b> |
| <b>CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES</b>   |   | <b>91</b> |
| 1.   | MATERIEL  | 91        |
| 1.1.   | <i>Matériel végétal</i>   | 91        |
| 1.1.1.   | Agrumes   | 91        |

|            |   |     |
|------------|---|-----|
| 1.2.       | <i>Matériel microbiologique</i> .....                                     | 91  |
| 1.2.1.     | <i>Escherichia coli</i> .....   | 91  |
| 1.2.2.     | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> WAT11 et WAT21 .....                      | 92  |
| 1.3.       | <i>Vecteurs</i> .....   | 92  |
| 1.3.1.     | pCR8 .....  | 92  |
| 1.3.2.     | pDONR™207 .....   | 93  |
| 1.3.3.     | pYeDP60_GW .....  | 94  |
| 1.3.4.     | pBIN m-gfp5-ER .....  | 95  |
| 1.3.5.     | pBNRF .....   | 95  |
| 1.3.6.     | pDe-Cas9-DsRed .....  | 96  |
| 1.3.7.     | pCAS9-DsRed .....   | 97  |
| 1.4.       | <i>Milieux de culture</i> .....   | 97  |
| 1.4.1.     | Milieux de culture pour bactéries .....                                   | 97  |
| 1.4.1.1.   | LB .....  | 97  |
| 1.4.2.     | Antibiotiques .....   | 97  |
| 1.4.3.     | Milieux de culture levures .....  | 98  |
| 1.4.3.1.   | YPGA .....  | 98  |
| 1.4.3.2.   | SGL .....   | 98  |
| 1.4.3.3.   | YPGE .....  | 98  |
| 1.4.3.4.   | YPL .....   | 98  |
| 1.4.4.     | Milieux de culture <i>in vitro</i> d'agrumes .....                        | 99  |
| 1.4.4.1.   | Solutions stocks .....  | 99  |
| 1.4.4.2.   | Milieu MS .....   | 99  |
| 1.4.4.3.   | Milieu MS/2 .....   | 99  |
| 1.4.4.4.   | Milieu MT .....   | 99  |
| 1.4.4.5.   | Milieu half and half .....  | 100 |
| 1.4.4.6.   | Milieu BH3 .....  | 100 |
| 1.4.4.7.   | Solutions pour la préparation et la transformation de protoplastes .....  | 101 |
| 1.4.4.7.1. | Solution enzymatique .....  | 101 |
| 1.4.4.7.2. | Solution de lavage de protoplastes .....                                  | 102 |
| 1.4.4.7.3. | Solution CPW .....  | 102 |
| 2.         | METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE .....                                    | 102 |
| 2.1.       | <i>Extraction de l'ADN génomique de plantes</i> .....                     | 102 |
| 2.2.       | <i>Extraction des ARN totaux</i> .....                                    | 102 |
| 2.3.       | <i>Synthèse d'ADNc par RT-PCR</i> .....                                   | 103 |
| 2.4.       | <i>Amplification de fragments d'ADN par PCR</i> .....                     | 103 |
| 2.5.       | <i>qPCR</i> .....   | 103 |
| 2.6.       | <i>Electrophorèse et purification d'un produit de PCR</i> .....           | 104 |
| 2.7.       | <i>Ligation dans le pCR®8/GW/TOPO®</i> .....                              | 104 |
| 2.8.       | <i>PCR sur colonies</i> .....   | 104 |
| 2.9.       | <i>LR et BP recombinaison</i> .....                                       | 105 |
| 2.10.      | <i>Transformation de bactéries électrocompétentes</i> .....               | 105 |
| 2.11.      | <i>Amplification et purification de plasmides</i> .....                   | 106 |
| 2.12.      | <i>Digestion de plasmides par enzymes de restriction</i> .....            | 106 |
| 2.13.      | <i>Concentration des plasmides</i> .....                                  | 106 |
| 3.         | METHODES D'EXPRESSION HETEROLOGUE ET D'ANALYSE DE PROTEINES .....         | 106 |
| 3.1.       | <i>Expression hétérologue d'une protéine dans la levure</i> .....         | 106 |
| 3.1.1.     | Préparation de levures compétentes .....                                  | 107 |
| 3.1.2.     | Transformation de levures .....   | 107 |
| 3.1.3.     | Expression des cytochromes P450 .....                                     | 107 |
| 3.1.4.     | Préparation de microsomes de levure .....                                 | 108 |
| 3.1.5.     | Western Blot .....  | 109 |
| 3.1.5.1.   | Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes ..... | 109 |
| 3.1.5.2.   | Immunodétection .....   | 110 |
| 3.1.6.     | Criblage d'activités enzymatiques .....                                   | 111 |
| 4.         | METHODES DE PHYTOCHIMIE .....   | 111 |

|        |   |            |
|--------|---|------------|
| 4.1.   | <i>Extraction de furocoumarines</i> .....   | 111        |
| 4.2.   | <i>Analyses chromatographiques</i> .....  | 112        |
| 4.2.1. | Analyses UPLC-MS .....  | 112        |
| 4.2.2. | Analyses HPLC-DAD des activités enzymatiques .....  | 112        |
| 5.     | METHODES DE CULTURE IN VITRO D'AGRUMES.....   | 112        |
| 5.1.   | <i>Repiquage des cals</i> .....   | 112        |
| 5.2.   | <i>Mise en culture des cellules en suspension</i> .....   | 112        |
| 5.3.   | <i>Isolement et purification des protoplastes à partir de cals embryogéniques de C. paradisi</i> .. | 113        |
| 5.4.   | <i>Comptage de protoplastes</i> .....   | 114        |
| 5.5.   | <i>Électroporation de protoplastes</i> .....  | 114        |
|        | <b>REFERENCES</b> .....   | <b>117</b> |
|        | <b>ANNEXES</b> .....  | <b>137</b> |

## Liste de figures

|  |    |
|--|----|
| FIGURE 1. SCHEMA REPRESENTANT LA GENEALOGIE DES PRINCIPALES ESPECES D'AGRUMES.....   | 2  |
| FIGURE 2. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'HERITAGE DES COUMARINES ET FUROCOUMARINES A PARTIR DES QUATRE TAXA ANCESTRAUX.....   | 3  |
| FIGURE 3. ÉLIMINATION SEQUENTIELLE D'UN MEDICAMENT, TEL QUE LA FELODIPINE, DANS LES ENTEROCYTES DE L'INTESTIN GRELE, PUIS LES HEPATOCYTES DU FOIE.....   | 5  |
| FIGURE 4. ÉVOLUTION DE LA PRODUCTION MONDIALE DU POMELO ET DE LA VALEUR MONDIALE DE LA PRODUCTION.....   | 7  |
| FIGURE 5. ÉVOLUTION DE LA CONSOMMATION DE JUS DE POMELO AUX ÉTATS-UNIS.....  | 8  |
| FIGURE 6. STRUCTURE DE BASE DE LA FAMILLE DES COUMARINES.....  | 9  |
| FIGURE 7. VOIE DE BIOSYNTHESE SIMPLIFIEE DES COUMARINES.....   | 10 |
| FIGURE 8. VOIE DE BIOSYNTHESE SIMPLIFIEE DES FUROCOUMARINES.....   | 12 |
| FIGURE 9. COUPURE CIBLEE DE L'ADN PAR CAS9.....  | 19 |
| FIGURE 10. CALS EMBRYOGENIQUES DE <i>CITRUS PARADISI</i> VAR. STAR RUBY.....   | 26 |
| FIGURE 11. RENDEMENTS DE PRODUCTION DE PROTOPLASTES A PARTIR DES CALS CULTIVES SUR MILIEU SOLIDE.....  | 27 |
| FIGURE 12. RENDEMENTS DE PRODUCTION DE PROTOPLASTES SELON LE TYPE DE CULTURE.....  | 29 |
| FIGURE 13. COURBE DE DECROISSANCE EXPONENTIELLE D'UN CHOC ELECTRIQUE PAR DECHARGE D'UN CONDENSATEUR.....   | 30 |
| FIGURE 14. EXPRESSION DU GENE RAPORTEUR DsRED.....   | 32 |
| FIGURE 15. INFLUENCE DU TEMPS CARACTERISTIQUE DANS LA TRANSFORMATION DE PROTOPLASTES.....  | 33 |
| FIGURE 16. INFLUENCE DE LA TENSION DANS LA TRANSFORMATION DE PROTOPLASTES.....   | 34 |
| FIGURE 17. INFLUENCE DE LA DENSITE DES CELLULES DANS LA TRANSFORMATION DE PROTOPLASTES.....  | 35 |
| FIGURE 18. INDUCTION DE L'EMBRYOGENESE A PARTIR DES PROTOPLASTES.....  | 35 |
| FIGURE 19. CULTURE DE PROTOPLASTES EN SUSPENSION ET EN MILIEU SOLIDE SIMULTANEMENT.....  | 36 |
| FIGURE 20. PROTOPLASTES EN CULTURE APRES TRANSFORMATION PAR ELECTROPORATION COMPLEMENTES AVEC LE MELANGE BH3 0,6M : MT 0,15 M (2:1, v/v).....  | 37 |
| FIGURE 21. PROTOPLASTES EN CULTURE APRES TRANSFORMATION PAR ELECTROPORATION.....   | 38 |
| FIGURE 22. ÉVOLUTION DES PROTOPLASTES EN CULTURE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE KANAMYCINE APRES UNE ELECTROPORATION SANS VECTEUR DE TRANSFORMATION.....  | 40 |
| FIGURE 23. REACTION CATALYSEE PAR LA PRENYLTRANSFERASE DE PANAIS.....  | 43 |
| FIGURE 24. CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE CpPT4. DES MICROSOMES DE FEUILLES DE TABAC SUREXPRESSANT CpPT4 SONT CAPABLE DE CATALYSER LA TRANSFORMATION D'UMBELLIFERONE MAJORITAIREMENT EN DMS..... | 43 |
| FIGURE 25. QUANTIFICATION PAR QPCR DE L'EXPRESSION DU <i>GFPT1</i> (ORTHOLOGUE DE <i>CPPT4</i> ).....  | 44 |
| FIGURE 26. ALIGNEMENT DE SEQUENCES CODANTES.....   | 45 |
| FIGURE 27. ANALYSE PREDICTIVE DE REGIONS TRANSMEMBRANAIRES DES GFPT1 CLONEES ET DE CPPT4.....  | 46 |
| FIGURE 28. CARTE GENOMIQUE DE GFPT1.....   | 47 |
| FIGURE 29. AMPLIFICATION DE LA SEQUENCE GENOMIQUE DU GFPT1.....  | 48 |
| FIGURE 30. ALIGNEMENT DE L'EXON 6 DES DIFFERENTES SEQUENCES.....   | 49 |

|   |    |
|---|----|
| FIGURE 31. STRATEGIE DE KNOCKOUT DU GENE GFPT1 PAR UNE APPROCHE CRISPR/Cas9. ....   | 50 |
| FIGURE 32. CONSTRUCTION DU PLASMIDE POUR LA TRANSFORMATION CRISPR/Cas9. ....  | 51 |
| FIGURE 33. MUTATIONS POSSIBLES INDUITES PAR NOTRE SYSTEME CRISPR/Cas9. ....   | 52 |
| FIGURE 34. PCR SUR PROTOPLASTES TRANSFORMES AVEC LES CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES CIBLES. ....  | 53 |
| FIGURE 35. MISE EN EVIDENCE D'UNE POSSIBLE MUTATION INDUITE PAR CRISPR/Cas9. ....   | 54 |
| FIGURE 36. EXPRESSION DE L'ARNM DES SEQUENCES CANDIDATES CODANTES POUR DES CYP82. ....  | 62 |
| FIGURE 37. ORGANISATION GENOMIQUE DES GENES DE LA FAMILLE CYP82. ....   | 63 |
| FIGURE 38. ARBRE PHYLOGENETIQUE CONSTRUIT AVEC DES SEQUENCES PEPTIDIQUES DE LA FAMILLE DES CYP82. ....  | 66 |
| FIGURE 39. VERIFICATION DES AMORCES SUR L'ADN GENOMIQUE. ....   | 69 |
| FIGURE 40. EXPRESSION TRANSCRIPTOMIQUE DES SEQUENCES CANDIDATES DE LA FAMILLE CYP82. ....   | 69 |
| FIGURE 41. WESTERN BLOT REALISES SUR DES MICROSOMES DE LEVURES WAT11 TRANSFORMEES AVEC LE pYEDP60 CONTENANT LES SEQUENCES CANDIDATES DE LA FAMILLE DE CYP82. .... | 71 |
| FIGURE 42. CHROMATOGRAMME HPLC-UV DE LA METABOLISATION DE PSORALENE EN XANTHOTOXOL PAR DES MICROSOMES DE LEVURES TRANSFORMES AVEC CYP71AZ4. ....                  | 72 |
| FIGURE 43. COUMARINES ET FUROCOUMARINES TESTEES LORS DES CRIBLAGES METABOLIQUES. ....   | 73 |
| FIGURE 44. EXPRESSION DES SEQUENCES CANDIDATES CANDIDATES. ....   | 75 |
| FIGURE 45. VERIFICATION DES AMORCES SUR L'ADN GENOMIQUE. ....   | 76 |
| FIGURE 46 EXPRESSION TRANSCRIPTOMIQUE DES SEQUENCES CANDIDATES DE LA FAMILLE CYP71. ....  | 77 |
| FIGURE 47. WESTERN BLOT REALISE SUR DES MICROSOMES DE LEVURES TRANSFORMES AVEC CYP71AN28 ET CYP706J12. ....   | 78 |
| FIGURE 48. METABOLISATION DE L'HERNARINE PAR DES MICROSOMES DE LEVURE EXPRIMANT LE CYP706. ....   | 79 |
| FIGURE 49. POSSIBLES METABOLISATIONS DE CYP706AJ12. ....  | 79 |
| FIGURE 50. PREUVE DE CONCEPT DE LA BIOCONVERSION DES MELANGES REACTIONNELS. ....  | 80 |
| FIGURE 51. BIOCONVERSION DANS LE MELANGE REACTIONNEL 3. ....  | 81 |
| FIGURE 52. RECAPITULATIF DE CE TRAVAIL DE THESE. ....   | 87 |
| FIGURE 53. CARTE DU VECTEUR DE CLONAGE PCR8™/GW/TOPO®. ....   | 93 |
| FIGURE 54. CARTE DU VECTEUR DE CLONAGE pDONR™207. ....  | 94 |
| FIGURE 55. CARTE DU VECTEUR D'EXPRESSION pYEDP60_GW®. ....  | 95 |
| FIGURE 56. CARTE DU VECTEUR pBNRF FOURNI PAR LE DR. FABIEN NOGUE. ....  | 96 |
| FIGURE 57. CARTE DU VECTEUR pDE-Cas9-DsRED FOURNI PAR LE DR. FABIEN NOGUE. ....   | 97 |

## Liste de tableaux

|  |     |
|--|-----|
| TABLEAU 1. METHODOLOGIE DE CULTURE DES CALS DE POMELO STAR RUBY EN MILIEU LIQUIDE H+H.....   | 28  |
| TABLEAU 2. SEQUENCES CANDIDATES CIBLES.....  | 51  |
| TABLEAU 3. LISTE DES SEQUENCES CANDIDATES CODANT POUR DES ENZYMES DE LA FAMILLE CYP82 POTENTIELLEMENT IMPLIQUEES DANS LA BIOSYNTHESE DES FUROCOUMARINES CHEZ LES AGRUMES. .... | 59  |
| TABLEAU 4. LISTE DES SEQUENCES CANDIDATES CODANTES POUR DES ENZYMES DE LA FAMILLE CYP82 IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DES FUROCOUMARINES CHEZ LES AGRUMES (SUITE).....         | 61  |
| TABLEAU 5. POSITION DES INTRONS DES SEQUENCES CANDIDATES ET DU CYP82D64.....   | 64  |
| TABLEAU 6. SEQUENCES CODANTES CANDIDATES CLONEES DANS UN PLASMIDE PERMETTANT DE FAIRE DE L'EXPRESSION HETEROLOGUE DANS LA LEVURE. ....   | 70  |
| TABLEAU 7. LISTE DES SEQUENCES CANDIDATES CODANTES POUR DES ENZYMES P450 IMPLIQUES DANS LA BIOSYNTHESE DES FUROCOUMARINES CHEZ LE AGRUMES. ....                                | 75  |
| TABLEAU 8. SEQUENCES CODANTES CANDIDATES CLONES CORRECTEMENT DANS LA LEVURE. ....  | 77  |
| TABLEAU 9. SOUCHES D'E. COLI ET LEUR UTILISATION SPECIFIQUE. ....  | 91  |
| TABLEAU 10. AMORCES DE SEQUENÇAGE DU pYEDP60_GW® EN AMONT ET EN AVAL DU GENE INSERE. ....  | 95  |
| TABLEAU 11. COMPOSITION DU MILIEU SOLIDE HALF AND HALF (H+H).....  | 100 |
| TABLEAU 12. COMPOSITION DU MILIEU BH3 POUR LA CULTURE DE PROTOPLASTES.....   | 101 |
| TABLEAU 13. SOLUTION ENZYMATIQUE POUR LA DIGESTION DE LA PAROI PECTOCELLULOSIQUE CALS DE POMELO. ....  | 101 |
| TABLEAU 14. COMPOSITION DE BASE DE LA SOLUTION CPW. ....   | 102 |
| TABLEAU 15. COMPOSITION DES GELS DE CONCENTRATION ET DE RESOLUTION POUR LE SDS-PAGE. ....  | 109 |

## Liste d'annexes

|  |     |
|--|-----|
| ANNEXE 1. MEDICAMENTS MONTRANT UNE INTERACTION AVEC LE JUS DE POMELO DE BAILEY, DRESSER, ET ARNOLD 2013 .... | 137 |
| ANNEXE 2. MISE AU POINT ET CALCULS DE L'ÉLECTROPORATION DES PROTOPLASTES .....                               | 139 |
| ANNEXE 3. AMORCES DE <i>GFPT1</i> .....  | 143 |
| ANNEXE 4. MATRICES D'IDENTITE DES SEQUENCES CANDIDATES .....   | 144 |
| ANNEXE 5. AMORCES DES GENES CANDIDATS.....   | 145 |
| ANNEXE 6. SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES GENES CANDIDATS CLONES.....   | 146 |
| ANNEXE 7. ARBRE PHYLOGENETIQUE ORIGINAL AVEC VALEURS BOOTSTRAPS .....  | 154 |
| ANNEXE 8. PROTOCOLE DE PREPARATION DES BACTERIES ELECTROCOMPETENTES.....                                     | 155 |
| ANNEXE 9. SOLUTIONS STOCKS POUR LA CULTURE IN VITRO D'AGRUMES .....  | 158 |
| ANNEXE 10. ARTICLE EN CO-PREMIER AUTEUR (SOU MIS ET ACCEPTE). .....  | 159 |

## Abréviations

|   |  |
|---|--|
| 4CL : 4-coumaroyl-CoA ligase  | DTT : dithiothréitol   |
| 5-MOP : 5-méthoxypsoralène (bergaptène)   | E : champ électrique   |
| 8-MOP : 8-méthoxypsoralène (xanthotoxine)   | EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique                       |
| AFLP : amplified fragment-length polymorphism   | EF1 $\alpha$ : facteur d'élongation 1 $\alpha$                     |
| AGAP : Unité Amélioration Génétique et<br>Adaptation des Plantes méditerranéennes                 | FAO : Food and Agriculture Organization of the<br>United Nations   |
| AS : angélicine synthase  | FPKM : Fragments Per Kilobase Million                              |
| B8M : bergaptène-8-monooxygénase  | GFPT1 : Grapefruit prényltransférase 1                             |
| BET : bromure d'éthidium  | GPP : géranyl diphosphate  |
| BLAST : basic local alignment search tool   | GW <sup>®</sup> : Gateway <sup>®</sup>                             |
| C : capacité  | H+H : milieu <i>Half and Half</i>                                  |
| C2'H : p-coumaroyl-CoA 2'-hydroxylase   | HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine<br>éthane sulfonique |
| C2H : acide cinnamique 2-hydroxylase  | iNOS : Inducible nitric oxide synthase                             |
| C4H : acide cinnamique 4-hydroxylase  | INRA : Institut National de la Recherche<br>Agronomique            |
| CO2H : acide 4-coumarique 2-hydroxylase   | KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and<br>Genomes                  |
| Cas9 : CRISPR associated protein 9  | LAE : Laboratoire Agronomie et Environnement                       |
| CIRAD : Centre de Coopération Internationale en<br>Recherche Agronomique pour le<br>Développement | LAF : Low Acid Foster  |
| CIPT1 : <i>Citrus limon</i> prényltransférase 1   | LB : milieu Luria-Bertani  |
| CoA : coenzyme A  | MS : marmésine synthase  |
| CpPT4 : <i>Citrus paradisi</i> prényltransférase 4  | MS : mass spectrometry   |
| CPR : cytochrome P450 réductase   | MS : Milieu basal Murashige et Skoog                               |
| CRISPR : Clustered regularly interspaced short<br>palindromic repeats                             | MT : Milieu basal Murashige et Tucker                              |
| crRNA : ARN CRISPR  | NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide<br>phosphate             |
| CS : columbianétine synthase  | NaPi : tampon phosphate de sodium                                  |
| CsLOB1 <i>Citrus sinensis</i> Lateral Organ Boundaries  | NHEJ : Non-Homologous End-Joining                                  |
| CsPDS : phytoène desaturase   | O-MT : O-méthyltransférase   |
| CYP : cytochrome P450   | P5M : psoralène-5-monooxygénase                                    |
| DMAPP : diméthylallyl diphosphate   | P8M : psoralène-8-monooxygénase                                    |
| DMS : diméthylsubérosine  | PAL : phénylalanine ammonia-lyase                                  |
| DMSO : diméthylsulfoxyde  | PAM : protospacer-adjacent motif                                   |
| DO : densité optique  | pb : paire de bases  |
| DsRed : protéine fluorescente rouge   |  |

PcPT : *Petroselinum crispum* prényltransférase

PCR : polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

PEG : polyéthylène glycol

PS : psoralène synthase

PspT1 : *Pastinaca sativa* prényltransférase

PT : prényltransférase

PPO : polyphénol oxydase

qPCR : PCR quantitative

R<sub>p</sub> : résistance de la solution

SaCas9 : *Streptococcus aureus* Cas9

SpCas9 : *Streptococcus pyogenes* Cas9

SATT : Société d'Accélération du Transfert de Technologies

SDS : dodécylsulfate de sodium

sgRNA : ARN guide

TAL : tyrosine ammonia-lyase

TALEN : Transcription activator-like effector nucleases

TE : Tris – EDTA

tracrRNA : ARN CRISPR trans-activant

USDA : United States Department of Agriculture

UV : ultraviolet

V<sub>0</sub> : tension initiale

WT : wildtype

Xcc : *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*

ZFN : Zinc-finger nuclease

τ : temps caractéristique

## Espèces citées et noms vernaculaires

### **Espèces végétales :**

*Ammi majus* : Queen Anne's Lace  
*Arabidopsis lyrata* : Arabette à feuilles lyrées  
*Arabidopsis thaliana* : Arabette des dames  
*Brassica napus* : Chou-navet blanc  
*Brassica oleracea* : chou  
*Brassica rapa*  
*Citrus aurantifolia* : limettier ou citron vert  
*Citrus aurantium* : orange amer ou bigaradier  
*Citrus clementina* : clémentine  
*Citrus hystrix* : combava  
*Citrus jambhiri* : citron rugueux  
*Citrus limon* : citron  
*Citrus maxima* : pamplemousse  
*Citrus medica* : cédrat  
*Citrus micrantha* : papeda  
*Citrus paradisi* : pomelo  
*Citrus reticulata* : mandarinier  
*Citrus sinensis* : orange douce  
*Daucus carota* : carotte  
*Eschscholzia californica* : pavot de Californie  
*Ficus carica* : figuier commun  
*Glycine max* : soja  
*Glycine soja* : soja sauvage

*Ipomoea batatas* : patate douce  
*Medicago sativa* : luzerne cultivée  
*Mentha piperita* : menthe poivrée  
*Nicotiana benthamiana*  
*Nicotiana tabacum* : Tabac  
*Ocimum basilicum* : basilic  
*Papaver somniferum* : pavot somnifère  
*Pastinaca sativa* : panais  
*Petroselinum crispum* : persil  
*Physcomitrella patens*  
*Pisum sativum* : pois  
*Ruta graveolens* : rue officinale  
*Sinopodophyllum hexandrum*  
*Stevia rebaudiana* : chanvre d'eau  
*Tarenaya hassleriana*  
*Vitis vinifera* : vigne

### **Bactéries et champignons :**

*Agrobacterium tumefaciens* : agrobactérie  
*Escherichia coli* : colibacille  
*Saccharomyces cerevisiae* : Levure de boulanger  
*Streptococcus aureus* : staphylocoque doré  
*Streptococcus pyogenes*  
*Xanthomonas citri* subsp. *Citri*



**Chapitre I :**  
**Synthèse Bibliographique**  
**et présentation des**  
**objectifs de la thèse**



# Chapitre I : Synthèse Bibliographique et présentation des objectifs de la thèse

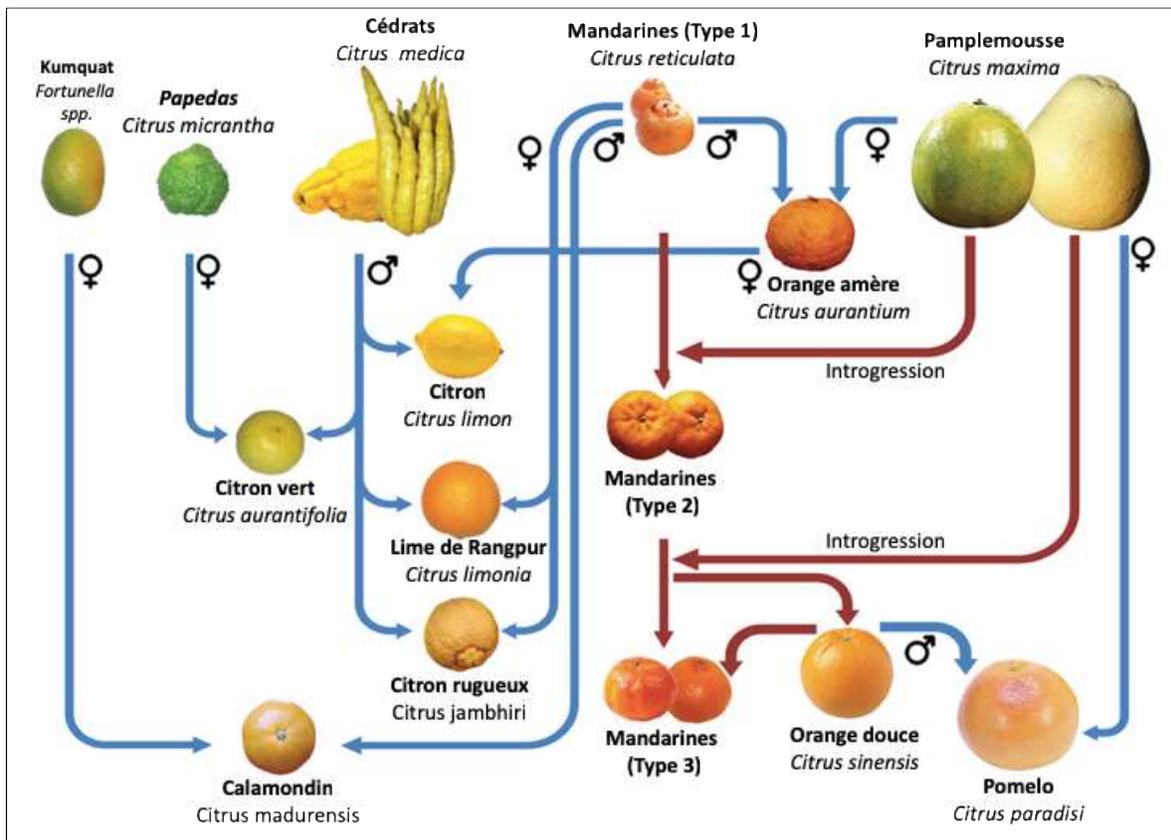
## 1. Les agrumes

### 1.1. Présentation des agrumes

Les agrumes appartiennent au genre *Citrus*. Avec les genres *Fortunella*, *Poncirus*, *Eremocitrus* et *Microcitrus* ils forment la sous-famille des Aurantioidae qui font partie de la famille des Rutacées. Cette famille comprend environ 160 genres et 1900 espèces de plantes (Groppo, Pirani, Salatino, Blanco, & Kallunki, 2008). La domestication des *Citrus* comestibles a commencé il y a plusieurs milliers d'années dans le sud-est du continent Asiatique. La taxonomie et l'origine des agrumes reste controversée. Elle est difficile à déchiffrer notamment à cause de leur système reproducteur impliquant des phénomènes d'auto-incompatibilité, de compatibilité sexuelle intra et inter-genres, mais aussi d'apomixie facultative ou de stérilité (Froelicher et al., 2011). Les variétés cultivées sont des clones généralement propagés par greffage et par production asexuelle de graines permettant ainsi de conserver les traits désirés. Plusieurs cultivars présentent des génotypes qui ont surgi par hybridation simple ou introgressive des espèces sauvages ancestrales. La diversité entre ces groupes augmente cependant par des mutations somatiques accumulées, généralement sans recombinaison sexuelle, soit dans un greffon, soit dans la progéniture issue des embryons apomictiques (G. A. Wu et al., 2014).

Il y a deux systèmes majeurs de classification des agrumes basés sur leurs caractéristiques morphologiques, celui de Swingle et Reece (1967) et celui de Tanaka (1977), reconnaissant respectivement 16 et 162 espèces. A côté de ces analyses morphologiques, des études moléculaires ont permis de mettre en évidence la relation entre plusieurs espèces de *Citrus* cultivées (Federici et al. 1998 ; Nicolosi et al. 2000 ; Barkley et al. 2006 ; Froelicher et al. 2011 ; Ollitrault et al. 2012 ; Garcia-Lor et al. 2013 ; G. A. Wu et al. 2014 ; Curk et al. 2015). Par cette approche, quatre taxons ont été identifiés comme étant les espèces ancestrales : *Citrus medica* (cédrats), *Citrus reticulata* (mandarine), *Citrus maxima* (pamplemousse) et *Citrus micrantha* (papada) (Nicolosi et al. 2000 ; García-Lor et al. 2012 ; G. A. Wu et al. 2014 ; G. Wu et al. 2018 ; Froelicher et al. 2011). Les espèces dites « secondaires » *Citrus sinensis* (orange douce), *Citrus aurantium* (orange amère), *Citrus paradisi* (pomelo), *Citrus limon* (L.) Burm. (citron jaune) et *Citrus aurantifolia* (citron vert) ont, de fait, été générées à partir de l'hybridation de ces quatre ancêtres. Récemment, Wu et al. (2018) ont analysé des séquences génomiques de plusieurs espèces d'agrumes et ont trouvé qu'il existait trois types de mandarines : les ancestrales (ou pures) de type 1, les

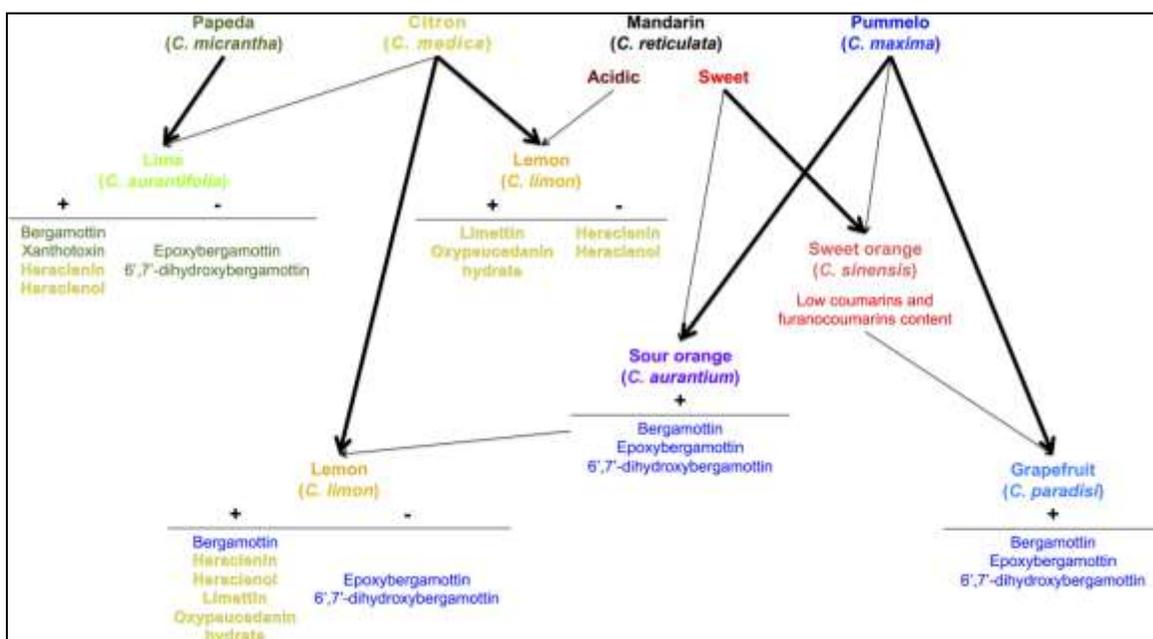
mandarines de type 2 (e.g. mandarines Ponkan et Dancy) et celles de type 3 (e.g. la mandarine Satsuma et la clémentine) qui ont été générées par plusieurs croisements de mandarines du type 1 avec des pamplemousses. Ces analyses ont également mis en évidence que les oranges et les pomelos étaient issus de croisements entre le pamplemousse et la mandarine. Les citrons jaunes et verts ont été générés à partir des citrons ancestraux (*C. medica*) hybridés avec des oranges amères et des papedas, respectivement (Figure 1). Finalement, toutes ces espèces secondaires ou hybrides interspécifiques ont généré des cultivars (ou variétés) qui sont issus généralement de mutations somatiques (Singh et Rajam 2009 ; G. A. Wu *et al.* 2014 ; G. Wu *et al.* 2018) et non d'hybridation sexuelle.



**Figure 1. Schéma représentant la généalogie des principales espèces d'agrumes.** Modèle le plus récent proposé par Wu *et al.* (2018) Les quatre variétés de *Citrus* ancestraux sont *Citrus medica* (citron), *Citrus reticulata* (mandarine), *Citrus maxima* (pamplemousse) et *Citrus micrantha* (papeda). Les lignes bleues montrent des croisements simples, tandis que les lignes rouges représentent des croisements plus complexes impliquant de multiples individus, générations et/ou rétrocroisements. Dans ce modèle, le kumquat est proposé comme espèce ancestrale appartenant au genre *Fortunella*, qui est sexuellement compatible avec les *Citrus*.

Enfin, plus récemment un chemotypage ciblé vers les coumarines et les furocoumarines dans 61 accessions d'agrumes a permis de démontrer que les profils

métaboliques sont liés à la phylogénie (Dugrand-Judek et al., 2015). Cette étude montre que les chémotypes des espèces secondaires sont hérités des espèces ancestrales (Figure 2). Par exemple, l'orange douce est un hybride faible producteur de furocoumarines. Cette caractéristique lui vient de la mandarine bien que le second parent soit le pamplemousse.



**Figure 2. Représentation schématique de l'héritage des coumarines et des furocoumarines à partir des quatre taxa ancestraux.**

Les relations parentales sont montrées par des flèches. Les flèches épaisses représentent de grandes ressemblances du chémotype. Les coumarines et les furocoumarines sont représentées par la même couleur du taxon ancestral qui les a transmis à ses descendants. Le symbole « + » indique la probable transmission des composés dans les espèces secondaires, le « - » indique leur disparition. Figure prise de Dugrand-Judek *et al.* 2015.

## 1.2. Le pomélo

Le pomélo (*Citrus paradisi*) est un fruit tropical de 8 à 15 cm de diamètre. Cette espèce a été découverte au XVIII<sup>ème</sup> siècle. Il en existe plusieurs variétés dont la couleur varie du blanc au rouge, selon leurs teneurs en lycopène (Peterson et al., 2006). Le pomélo est un fruit riche en vitamines, minéraux, pectine et autres composés phytochimiques tels que les flavonoïdes, les limonoïdes, les coumarines et les furocoumarines. Ces fruits consommés pour la chair mais aussi pour leurs produits dérivés, présentent des bienfaits pour la santé (Hung *et al.* 1995 ; Melough *et al.* 2018). Comme les autres agrumes, ils contiennent de nombreux nutriments essentiels tels que la vitamine C, le folate, les fibres alimentaires et des minéraux, en particulier du potassium (Codoñer-Franch et Valls-Bellés 2010). L'ensemble de ces molécules, confèrent aux pomelos des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-cancérigènes et neuroprotectrices (Hung *et al.* 2017).

### **1.2.1. Propriétés anticancéreuses**

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que le jus de pomelo avait des propriétés préventives contre le cancer, mais aussi des propriétés antigénotoxiques (Madrigal-Bujaidar *et al.* 2013 ; Razo-Aguilera *et al.* 2011 ; Miyata *et al.* 2002 ; Argüelles *et al.* 2012) en lien avec des molécules telles que les flavonoïdes et les limonoïdes. Parmi ces composés on trouve la naringine et l'hespéridine qui sont les deux flavonoïdes majeurs présents dans le pomelo. Au cours des dernières années, de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont suggéré qu'en plus des flavonoïdes, les furocoumarines et les coumarines présentaient également des activités anticancéreuses contre de nombreux types de cancer, notamment le cancer du sein, le cancer de la peau et la leucémie. C'est le cas par exemple des furocoumarines comme le bergaptol, le bergaptène, la bergamottine ou encore des coumarines comme l'auraptène (Kim *et al.* 2014 ; Mousavi *et al.* 2015 ; Krishnan *et al.* 2009 ; Ge *et al.* 2016 ; De Amicis *et al.* 2015 ; Panno *et al.* 2009).

### **1.2.2. Propriétés antioxydantes**

Les propriétés antioxydantes des limonoïdes, des flavonoïdes et des coumarines d'agrumes ont été comparées dans différentes expérimentations faites *in vitro* par Yu *et al.* (2005). Dans cette étude, les chercheurs ont montré que l'acide  $\beta$ -carotène-linoléique présentait une activité antioxydante plus forte comparée aux limonoïdes et au bergaptène. D'autres travaux ont mis en évidence que le bergaptène et le psoralène pouvaient retarder la peroxydation des lipides dans le cerveau des rats (Phuwapraisirisan *et al.* 2006). Le bergaptol, purifié à partir du jus de pomelo présente lui aussi une haute activité antioxydante tandis que l'auraptène issu du même jus, dispose d'une activité antioxydante assez faible en comparaison (Girennavar, Jayaprakasha, Jadegoud, Nagana Gowda, & Patil, 2007). Plus récemment il a été montré que l'activité antioxydante des agrumes provenait de la combinaison de ces composés phytochimiques en mélange et de leur action synergique avec la vitamine C (Codoñer-Franch & Valls-Bellés, 2010).

### **1.2.3. Propriétés anti-inflammatoires**

L'activité anti-inflammatoire des furocoumarines accumulées par le pomelo a été étudiée dans le cas du bergaptol dont l'activité provient en partie de la régulation positive de l'expression de l'hème oxygénase-1. Cette enzyme joue un rôle protecteur contre les réponses inflammatoires en augmentant l'activité antioxydante (Uto *et al.*, 2015). En 2000, Wang et ses collaborateurs ont étudié les activités biologiques de l'oxypeucedanine et de l'hydrate d'oxypeucedanine qui sont des furocoumarines mineures présentes dans le pomelo (Wang *et al.* 2000). L'oxypeucedanine inhibe significativement la production de nitrite et l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) dans les cellules RAW

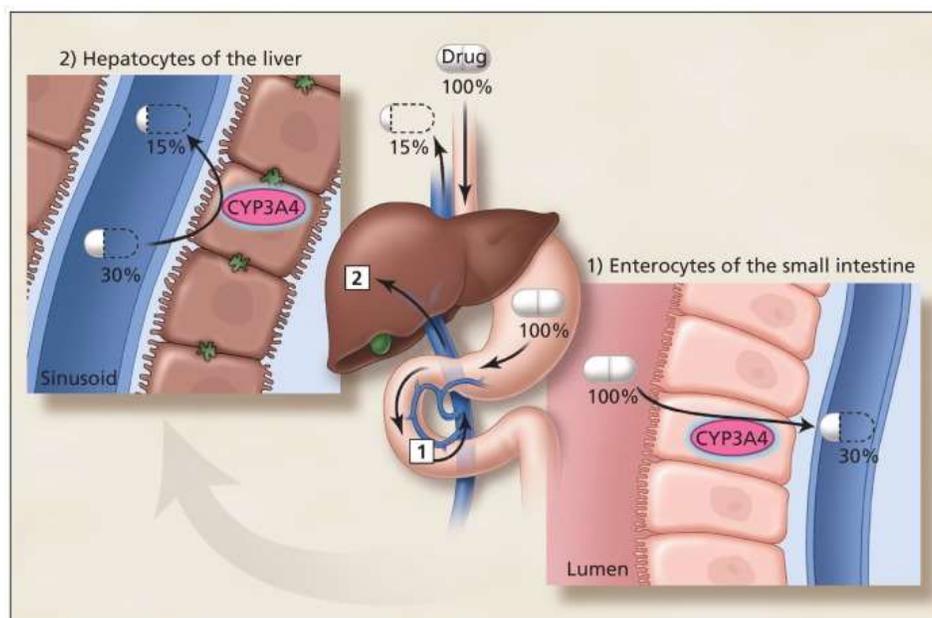
264.7 activées par des lipopolysaccharides. Cette activité anti-inflammatoire n'a pas été démontrée pour l'hydrate d'oxypeucedanine.

#### 1.2.4. Propriétés anti-ostéoporose

Le bergaptène présente des propriétés anti-ostéoporose mises en évidence dans le cadre d'expérimentations *in vitro* et *in vivo* (Meng *et al.* 2004 ; Tang *et al.* 2008). Certaines études ont démontré que la consommation de pomelo pouvait moduler la résistance des os chez le rat et ce en lien avec la présence de cette molécule (Deyhim *et al.* 2008 ; Deyhim *et al.* 2006 ).

#### 1.2.5. L'effet pomelo

A côté de ces nombreux aspects positifs, le pomelo a également des propriétés délétères pour la santé humaine. Il a ainsi été montré que le jus de pomelo pouvait être responsable de surdosages médicamenteux pour plus de 85 médicaments actuellement commercialisés (listés dans l'Annexe 1). Ce phénomène est connu sous le nom d' « effet pomelo » (ou *grapefruit juice effect* en anglais). Les médicaments concernés possèdent 3 caractéristiques essentielles: ils sont administrés par voie orale, ils ont une biodisponibilité orale très faible (<10%) à intermédiaire (30% à 70%) et ils sont métabolisés par les cytochromes P450 exprimés notamment dans le foie (Bailey *et al.* 2013).



**Figure 3. Élimination séquentielle d'un médicament, tel que la féلودipine, dans les entérocytes de l'intestin grêle, puis les hépatocytes du foie.**

Les pourcentages de la dose initiale disponibles avant et après le passage à travers la paroi intestinale et le foie sont indiqués. Bien que la féلودipine soit absorbée à 100 % par le tractus gastro-intestinal, sa biodisponibilité n'est que de 15 % après son administration par voie orale. Figure prise de David G. Bailey, Dresser, et Arnold 2013

Pour comprendre cet effet pomelo il faut savoir que les médicaments sont considérés par l'organisme comme des molécules toxiques et sont dégradés puis éliminés par des mécanismes de détoxification enzymatique. CYP3A4 est un des acteurs de ce dispositif. Cette enzyme de la superfamille des cytochromes P450 est capable de métaboliser un grand nombre de médicaments (David G. Bailey et al., 2013). Elle est exprimée dans les cellules épithéliales (entérocytes) de l'intestin grêle et le côlon, ainsi que dans les cellules parenchymateuses du foie (hépatocytes). Les médicaments administrés par voie orale doivent passer 2 barrières « filtrantes » avant d'atteindre la circulation sanguine (Figure 3). Lors de chaque passage, une partie des médicaments est dégradée. Dans le cas de la félodipine, un antihypertenseur, le dosage généralement prescrit mène à une biodisponibilité finale qui est réduite à 15 % de la dose orale. Quand ce médicament est consommé avec du jus de pomelo, on constate la présence de près de 45 % de la dose initiale dans le sang. Ce surdosage peut avoir des conséquences graves pour les patients.

Guo et Yamazoe ont montré que les furocoumarines étaient les responsables de cet effet pomelo (Guo & Yamazoe, 2004). En effet, ces molécules sont transformées en intermédiaires réactifs par CYP3A4 et se lient de manière covalente au site actif de l'enzyme en provoquant son inactivation irréversible (He *et al.* 1998 ; Girenavar *et al.* 2007). Toutes les formes du pomelo (jus fraîchement pressé, concentré congelé et fruit entier) peuvent potentiellement réduire l'activité de CYP3A4. Un pomelo entier ou 200 mL de jus sont ainsi suffisants pour entraîner une augmentation cliniquement significative de la concentration du médicament dans le sang et les effets indésirables qui en dérivent (D. G. Bailey et al., 2000). Les oranges amères, le citron vert et les pamplemousses génèrent également cet effet pomelo (David G. Bailey, Dresser, et Bend 2003 ; Malhotra *et al.* 2001). Les oranges douces, par contre, ne produisent pas de furocoumarines (Dugrand-Judek et al., 2015) et ne présentent pas d'effet pomelo (David G. Bailey, Malcolm, Arnold, & Spence, 1998).

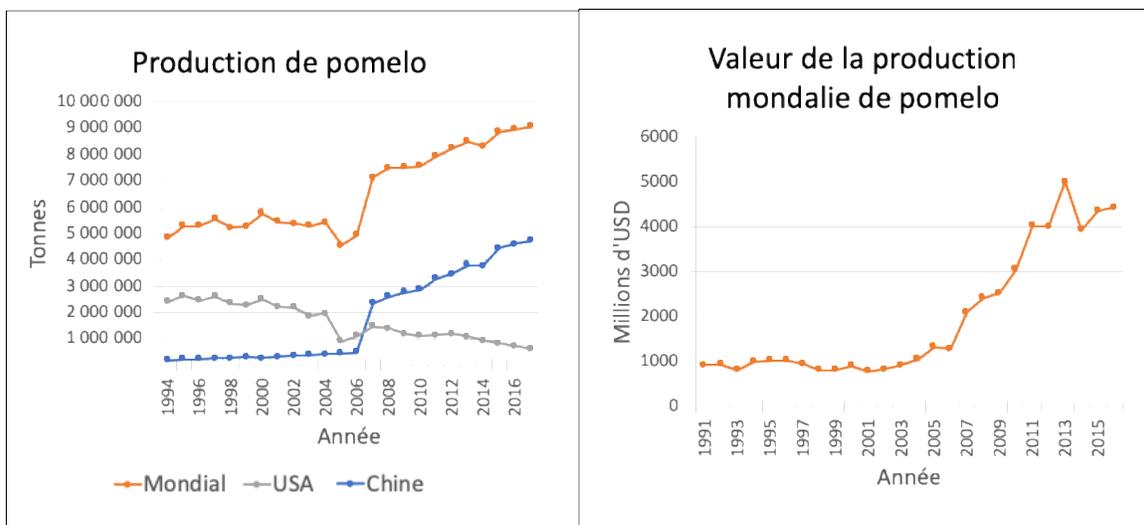
#### **1.2.6. Pomelo et furocoumarines**

Les furocoumarines prédominantes chez le pomelo sont le bergaptol, le bergaptène, la bergamottine, l'époxybergamottine et la 6',7'-dihydroxybergamottine. Les dimères de furocoumarines (paradisine A, B et C) sont plus concentrés dans les variétés blanches que dans les variétés rouges de pomelo (Fukuda, Guo, Ohashi, Yoshikawa, & Yamazoe, 2000). Dugrand-Judek *et al.* 2015 ont également signalé que les concentrations d'époxybergamottine dans la peau des variétés Duncan, Marsh et Star Ruby étaient beaucoup plus élevées que celles observées dans la pulpe. Plusieurs auteurs ont attribué au bergaptol et ses dérivés (le bergaptène, la bergamottine, l'époxybergamottine et la 6,7-dihydroxybergamottine) qu'ils étaient la cause de l'effet pomelo (Wangensteen *et al.* 2003 ; Messer *et al.* 2012 ; Girenavar *et al.* 2007 ; Ohnishi *et al.* 2000 ; Kimura *et al.* 2010).

Girenavar *et al.* (2007), a ajouté l'auraptène à la liste. Des études réalisées par différents chercheurs indiquent enfin que les paradisines A, B et C présentaient une forte inhibition de CYP3A4 (Girenavar *et al.* 2007 ; Ohnishi *et al.* 2000 ; Ohta *et al.* 2002). Les furocoumarines sont également des photosensibilisants potentiels pouvant causer une phytophotodermatite grave après contact avec la peau ou une ingestion suivie d'une exposition aux rayons UV du soleil (Calka, Akdeniz, Metin, & Behçet, 2005; Robl, Robl, Marinoni, Abagge, & Carvalho, 2013). Cette propriété de photosensibilisation est un problème notamment avec les huiles essentielles d'agrumes, car elles sont largement utilisées dans les parfums et les cosmétiques.

### 1.3. Importance économique des agrumes

Les agrumes font partie des fruits les plus produits dans le monde. Ils représentent 17 % de la production totale des fruits selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), soit 138 millions de tonnes (chiffres de 2017). Deux tiers de la production globale est assurée par la Chine, le Brésil, les États Unis, l'Inde, le Mexique et l'Espagne (Codoñer-Franch et Valls-Bellés 2010 ; Zou *et al.* 2016). Les agrumes les plus produits au monde sont les oranges (73 millions de tonnes), les mandarines (33 millions de tonnes), les citrons jaunes et verts (17 millions de tonnes) et les pomelos (9 millions de tonnes) (FAOSTAT).



**Figure 4. Évolution de la production mondiale du pomelo et de la valeur mondiale de la production.**

Source : FAO (<http://www.fao.org/faostat/>).

Concernant plus spécifiquement le pomelo, ce sont la Chine et les États Unis qui sont les producteurs leaders. D'un point de vue mondial, la production de ce fruit est en hausse (Figure 4) et la Chine en a produit presque la moitié en 2017. Aux États-Unis la production

est en sensible diminution en lien avec des conditions météorologiques compliquées mais également en lien avec l'émergence de la maladie du dragon jaune (USDA). La valeur du marché des pomelos a aussi augmenté, dépassant en 2016 les 4 milliards d'euros (Figure 4). Les variétés majeures de pomelo sont les variétés Pink, Ruby Red, Thompson, White Marsh et Star Ruby (Madrigal-Bujaidar *et al.* 2013 ; Chudnovskiy *et al.* 2014 ; Mahgoub 2002). Parmi celles-ci, la préférence du marché aux États Unis penche pour les variétés « rouges » (Rio Star®, Rio Red, Star Ruby, Ruby Red) alors qu'en Asie ce sont les variétés « blanches » (Marsh, Duncan) qui sont les plus appréciées.

Si la production mondiale tend à augmenter, on constate une diminution de la consommation sur l'un des principaux marchés qui est celui des États Unis. La consommation du jus de pomelo qui atteignait 10 L par personne par an en 1977 a diminué à environ 0,76 L par personne par an (Figure 5). Cette diminution semble faire suite aux études sur l'effet pomelo et résulte d'une prise de conscience de la part des consommateurs et des médecins par rapport aux dangers liés à la consommation simultanée de jus de pomelo et de médicaments (ABS O Conseil, 2016).

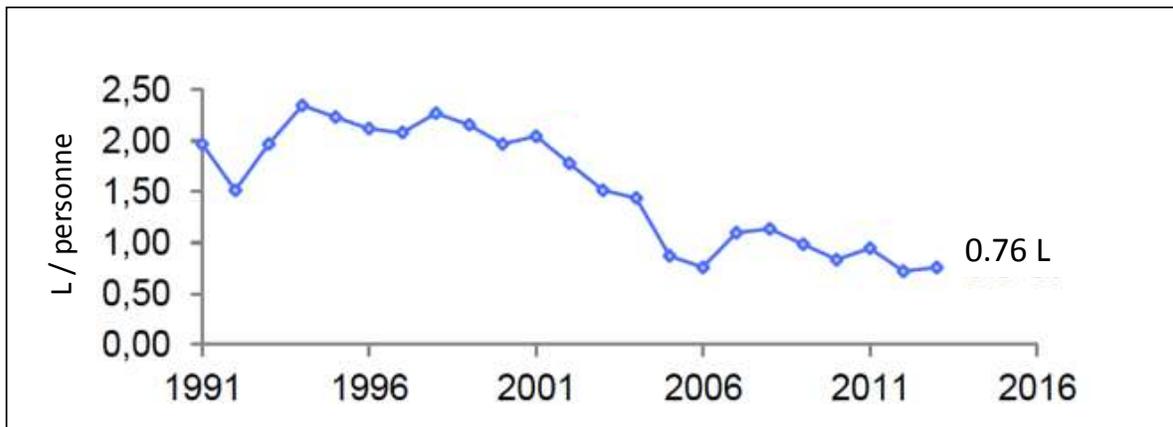


Figure 5. Évolution de la consommation de jus de pomelo aux États-Unis.

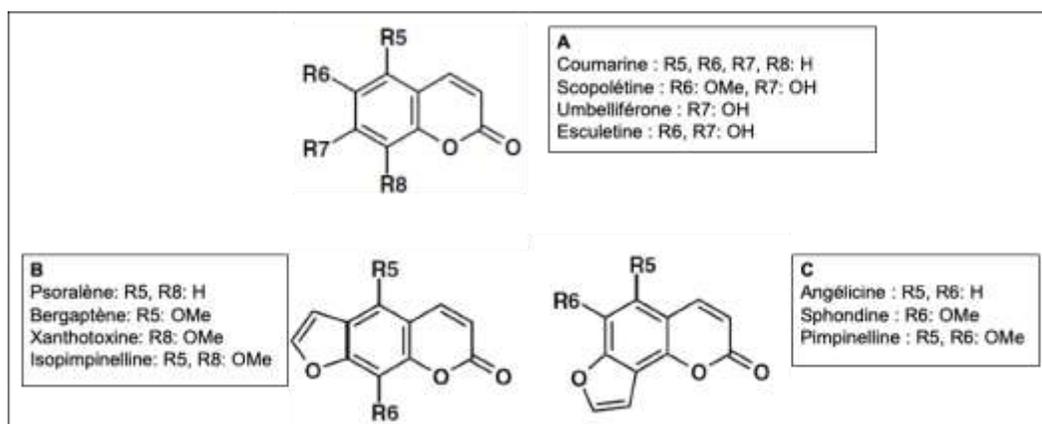
Source : étude de marché réalisé par ABSO Conseil.

L'élimination des furocoumarines des Pomelos est, de fait, devenu un enjeu économique fort. Plusieurs études ont permis la mise au point de méthodes de traitement pour éliminer ces molécules des pomelos. On trouve notamment des approches de traitement thermique, d'irradiation par les UV, d'absorption par des champignons autoclavés et de filtration (Myung, Narciso, & Manthey, 2008; Paine *et al.*, 2006; Uesawa & Mohri, 2006a, 2006b). Cette « défurocoumarination » peut être effectuée à différents niveaux de la chaîne de valeur, néanmoins elle est effectuée principalement par les industriels du secteur cosmétique, car ces traitements peuvent s'avérer très coûteux (ABS O Conseil, 2016) et peuvent altérer la qualité des produits dérivés de pomelo.

## 2. La biosynthèse des coumarines et furocoumarines

### 2.1. Première étape : les coumarines

Les coumarines sont des molécules largement répandues dans les plantes alors que les furocoumarines sont majoritairement décrites chez les Apiaceae, Rutaceae, Moraceae et Fabaceae (Bourgaud *et al.* 2006). La structure chimique des coumarines consiste en un noyau benzène couplé à un noyau  $\alpha$  pyrone (Figure 6). Les hydroxylations, prénylations, alkylations, o-méthylations et glycosylations peuvent mener à la production d'une grande variété de molécules.

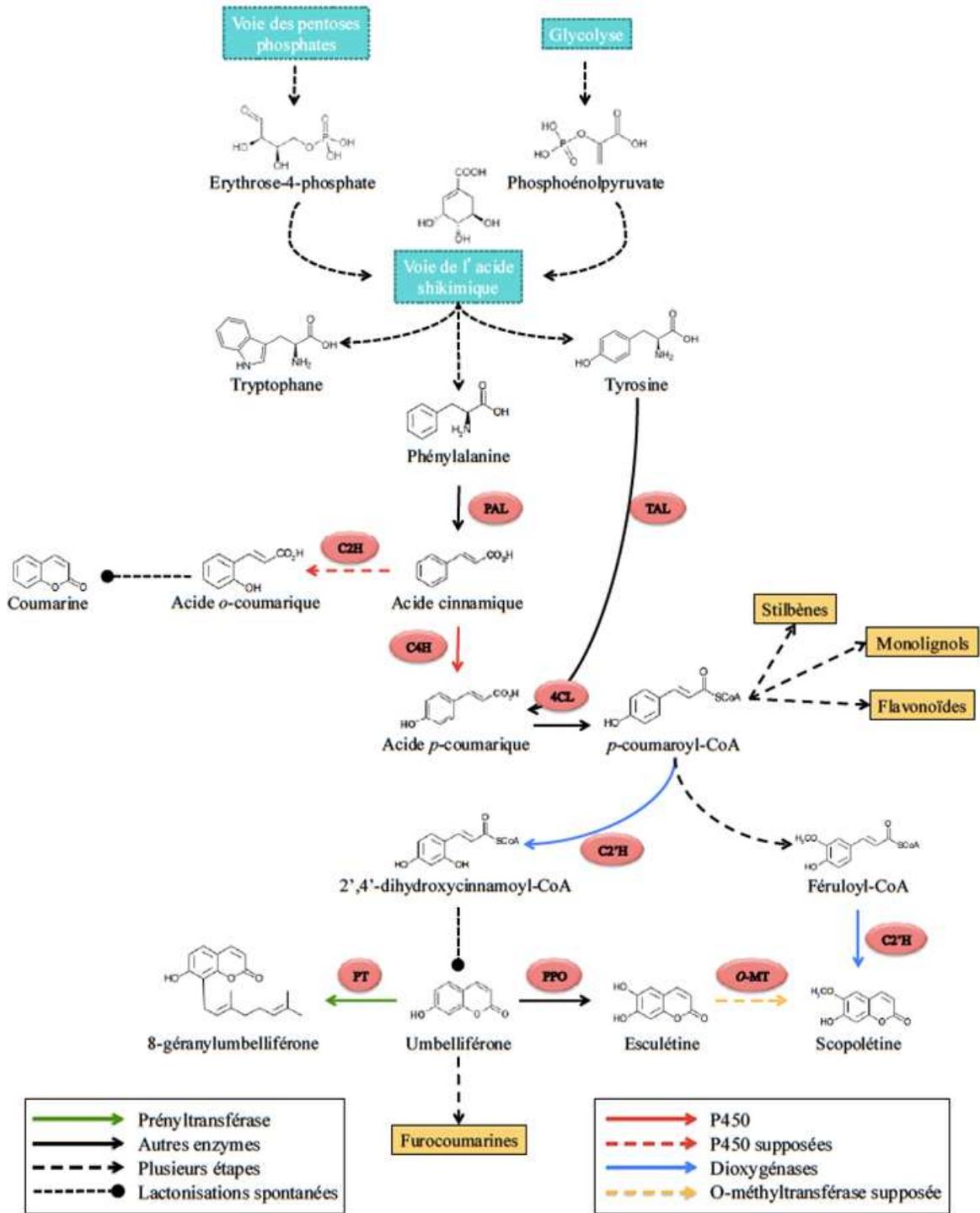


**Figure 6. Structure de base de la famille des coumarines.**

Coumarines (A), furocoumarines linéaires (B) et furocoumarines angulaires (C) et des exemples des molécules substituées.

La synthèse des coumarines qui sont les précurseurs des furocoumarines démarre à partir de la phénylalanine qui est désaminée par la phénylalanine ammonia-lyase puis convertie en acide *trans*-cinnamique par la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) pour former de l'acide *p*-coumarique. La C4H, est la première monooxygénase appartenant à la famille des cytochromes P450 CYP73, impliquée dans la synthèse de ces molécules (Teutsch *et al.* 1993 ; Gravot *et al.* 2004). L'acide *p*-coumarique est ensuite estérifié par la 4-coumaroyl-CoA ligase, pour former le *p*-coumaroyl-CoA. Cette molécule est un élément carrefour de la synthèse des phénylpropanoïdes puisqu'elle est à l'origine des coumarines, des flavonoïdes, des anthocyanes, des tanins ou encore des lignines (Dixon et Paiva 1995 ; Schoch 2002 ; Bourgaud *et al.* 2006).

Dans le cas de la synthèse des furocoumarines, cette molécule est hydroxylée en position *ortho* par une dioxygénase  $\alpha$ -cétoglutarate dépendante, la *p*-coumaroyl-CoA 2'-hydroxylase (C2'H). (Vialart *et al.* 2012, Matsumoto *et al.* 2012, Roselli *et al.* 2016). Le 2,4-dihydroxycinnamoyl-CoA formé est spontanément lactonisé pour donner de l'umbelliférone. (Figure 7).



**Figure 7. Voie de biosynthèse simplifiée des coumarines.**

PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; TAL : tyrosine ammonia-lyase ; C2H : acide cinnamique 2-hydroxylase ; C4H : acide cinnamique 4-hydroxylase ; 4CL : 4-coumarate-CoA ligase ; C2'H : acide 4-coumarique 2-hydroxylase ; C2'H : p-coumaroyl-CoA 2'-hydroxylase ; PPO : polyphénol oxydase ; O-MT : O-méthyltransférase ; PT : prényltransférase. Image prise de Dugrand-Judek 2015.

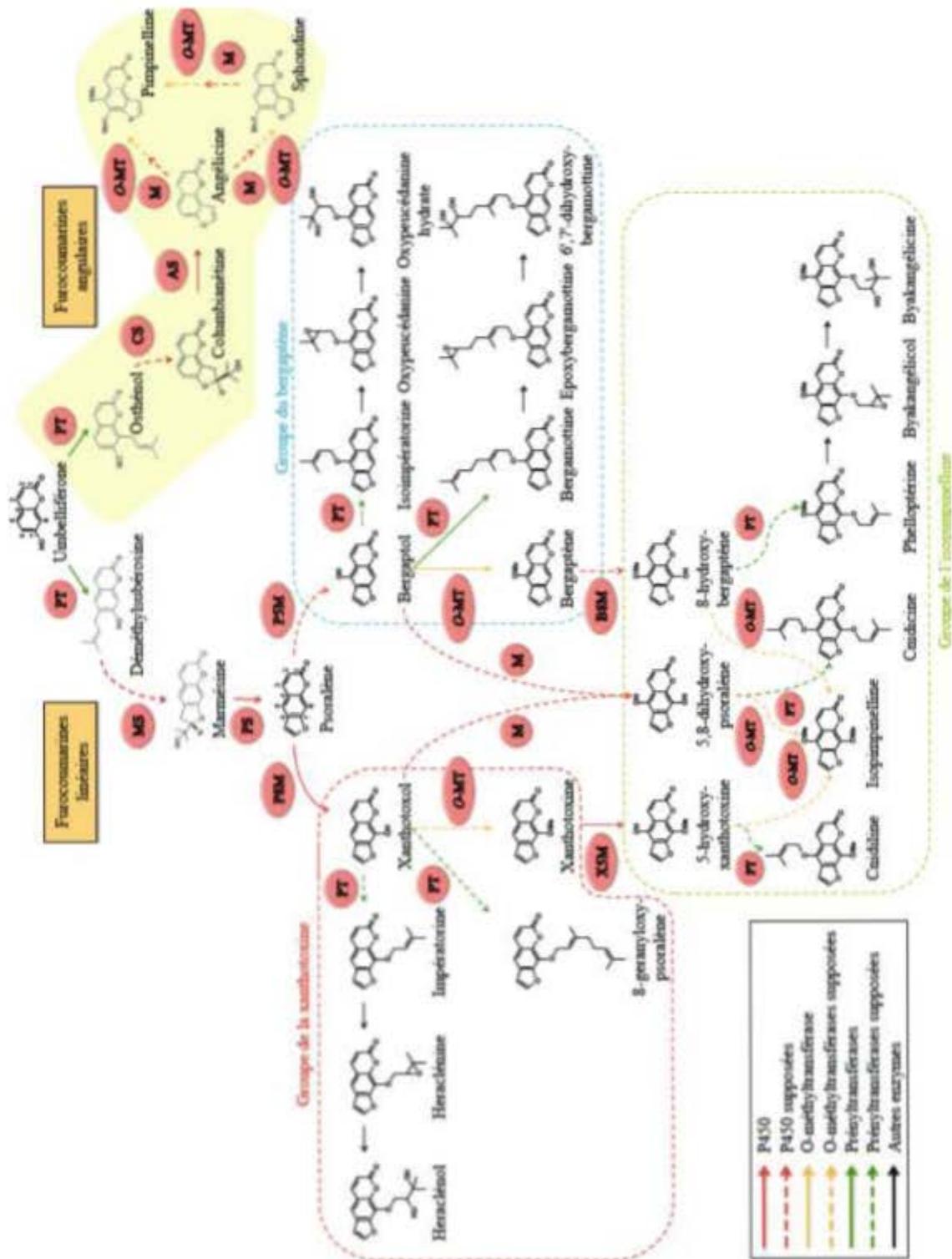
Différentes C2'H ont été caractérisées à ce jour à partir de *Ruta graveolens* et *Ipomea batatas*, des plantes relativement différentes d'un point de vue phylogénétique. Récemment des enzymes très proches qui catalysent la synthèse de la fraxétine à partir de la scopolétine impliquées dans l'homéostasie du fer (Siwinska *et al.* 2018) ont également été caractérisées chez *A. thaliana*. Ces différents travaux concernant les dioxygénases montrent l'importance de cette famille multienzymatique dans la synthèse de coumarines et démontrent ainsi que ces étapes sont bien conservées chez les angiospermes.

## 2.2. Vers les furocoumarines

Les furocoumarines résultent de la fusion entre un groupement furane et un noyau coumarinique. En fonction de la position de ce noyau furane, les furocoumarines peuvent être linéaires ou angulaires (Figure 8). La voie de la biosynthèse des furocoumarines a été caractérisée d'un point de vue biochimique par l'utilisation de composés radiomarqués entre 1960 et 1980 (Brown, Towers, et Wright 1960 ; Brown 1962, 1985 ; Hamerski *et al.* 1990).

L'umbelliférone est la molécule clef dans la synthèse des furocoumarines. Une prénylation par du diméthylallyl pyrophosphate en position C6 mène à la formation de la déméthylsuberosine (DMS), tandis qu'une prénylation en position C8 donne de l'osthénol. Ces deux molécules sont les précurseurs des isomères linéaires et angulaires des furocoumarines, respectivement. La première activité de prénylation a été décrite *in vitro* par Dhillon et Brown (1976) à partir d'extrait de *R. graveolens*. Il a été nécessaire d'attendre près de 40 ans pour qu'en 2014 Karamat et ses collaborateurs identifient le premier gène codant pour une prényltransférase (PcPT) capable de prényler l'umbelliférone pour générer préférentiellement la DMS par rapport à l'osthénol chez le persil. Deux autres enzymes (PsPT1 et PsPT2), phylogénétiquement très proches, ont également été caractérisées chez *Pastinaca sativa* (panais) (Munakata *et al.*, 2016). PsPT1 et PsPT2 catalysent la formation préférentielle de DMS ou d'osthénol, respectivement.

D'après Hamerski et Matern (1988), les étapes post DMS ou post osthénol sont catalysées majoritairement par des enzymes de la famille des cytochromes P450. Un mécanisme réactionnel de la cyclisation du noyau furane a été proposé pour la première fois en 1970 (Brown *et al.* 1970 ; Matern *et al.* 1988) : l'oxydation enzymatique de la DMS catalysée par la marmésine synthase produit un époxyde correspondant à la 6-(2-méthyl-2,3-époxybutyl)-umbelliférone. L'hydratation de l'époxyde génère un diol qui est finalement cyclisé en (+)-marmésine. A ce jour, l'enzyme catalysant cette réaction n'a pas encore été identifiée.



**Figure 8. Voie de biosynthèse simplifiée des furocoumarines.**

PT : prényltransférases ; MS : marmésine synthase ; CS : columbianétine synthase ; PS : psoralène synthase ; AS : angélicine synthase ; M : mono-oxygénases ; O-MT : O-méthyltransférases ; P8M : psoralène-8-mono-oxygénase ; P5M : psoralène-5-mono-oxygénase ; X5M : xanthotoxine-5-mono-oxygénase ; B8M : bergaptène-8-mono-oxygénase. Les molécules sur fond jaune sont des furocoumarines angulaires, non produites par les agrumes. Image prise de Dugrand-Judek 2015.

La synthèse du psoralène (et de son isomère l'angélicine) a également été étudiée d'un point de vue biochimique par Hamerski et Matern à partir de cellules en culture d'*Ammi majus*. Mais c'est en 2007 puis en 2009 que Larbat et ses collaborateurs ont identifié les premiers gènes codants pour des enzymes responsables de leur synthèse chez *Ammi majus* puis chez le panais (Larbat et al., 2009, 2007). Ces enzymes appartiennent au clan 71 de la superfamille enzymatique des cytochromes P450 et ont été identifiées dans la littérature comme affiliées à la sous famille CYP71AJ.

Le psoralène et l'angélicine sont les furocoumarines les plus simples. Ces molécules peuvent ensuite être fonctionnalisées par différents types de réaction. Par exemple, l'hydroxylation du psoralène en position 5 et/ou 8 mène à la formation de bergaptol (5-hydroxypsoralène), de xanthotoxol (8-hydroxypsoralène) et de 5,8-dihydroxypsoralène (Dugrand-Judek et al., 2015). La formation du bergaptol catalysée par le psoralène 5-monooxygénase en présence d'oxygène et de NADPH a été caractérisée à partir de microsomes de cellules d'*A. majus* en culture comme étant cytochrome P450 dépendante (Hamerski & Matern, 1988). L'hydroxylation du psoralène en position C8 a également été caractérisée enzymatiquement. Ainsi en 2018, (Krieger et al., 2018) et ses collaborateurs ont identifié CYP71AZ4 comme responsable de cette réaction chez le panais.

D'autres séquences nucléotidiques codants pour des P450 impliquées dans le métabolisme des furocoumarines ont été identifiées chez le panais, *A. majus*, *A. thaliana* et le pomelo. Les travaux de Krieger *et al*, montrent que CYP71AZ1 (*A. majus*) et CYP71AZ6 (panais) qui sont codées des gènes orthologues de la psoralène hydroxylase (CYP71AZ4), peuvent hydroxyler la xanthotoxine en 5-hydroxy xanthotoxine. Cette même activité d'hydroxylation de la xanthotoxine a été décrite dès 2008 et est catalysée par des enzymes de la sous famille CYP82C chez *A. thaliana*, une plante qui pourtant n'est pas productrice de furocoumarines (Kruse et al., 2008). Les travaux de thèse de Dugrand-Judek (2015) renforcent ces résultats puisqu'elle a montré qu'un P450 d'agrumes de cette même famille CYP82 pouvait catalyser le même type de réaction.

De manière intéressante, certaines de ces enzymes ne sont pas spécifiques des réactions de la voie de biosynthèse des Furocoumarines. Parfois elles catalysent également l'hydroxylation de coumarines. C'est le cas par exemple de CYP71AZ4 qui réalise l'hydroxylation de la scopolétine pour mener à la fraxétine chez le panais. Pour rappel, cette même réaction est catalysée par une dioxygénase chez *Arabidopsis*. Cette diversité enzymatique pour catalyser la même réaction chez des plantes différentes semble donc refléter des processus évolutifs convergents. Tous comme les CYP71AZ, les CYP82 montrent une plasticité de leur site actif puisque deux études ont montré que CYP82C2 et CYP82C4 intervenaient également dans la synthèse de 4-hydroxyindole-3-carbonyle nitrile et de

sidéretine à partir d'indole-3-carbonyle nitrile et de fraxétine, respectivement (Rajniak, Barco, Clay, & Sattely, 2015; Rajniak et al., 2018).

Le bergaptol et le xanthotoxol sont ensuite méthylés par une bergaptol/xanthotoxol O-méthyltransférase. La bergaptol-O-méthyltransférase a été clonée et caractérisée enzymatiquement à partir d'*A. majus* par Hehmann et ses collaborateurs. A noter que le xanthotoxol n'est pas métabolisé par cette enzyme (Hehmann, Lukačín, Ekiert, & Matern, 2004). Le bergaptol peut également être géranylé pour former la bergamottine. La prényltransférase catalysant cette réaction a été caractérisée à partir de microsomes de flavedo de citron dans lesquels de grandes quantités de coumarines prénylées sont accumulées (Munakata et al., 2012).

Le 8-hydroxybergaptène et la 5-hydroxyxanthotoxine sont des précurseurs de l'isopimpinelline. Les deux séries de méthylations intervenant avant et après ces composés, seraient effectuées par deux O-méthyltransférases (Thompson *et al.* 1978)

### **3. Sélection et amélioration des agrumes.**

#### **3.1. L'amélioration conventionnelle des agrumes et ses difficultés**

L'hybridation conventionnelle est utilisée par les agrumiculteurs pour sélectionner des caractéristiques désirées chez les agrumes et générer des nouvelles variétés. Cette technique met généralement l'accent sur la sélection des génotypes obtenus par mutagenèse spontanée ou induite. L'approche traditionnelle de l'hybridation des arbres implique la sélection avec le phénotype souhaité, puis leur intégration dans les programmes d'amélioration (Singh & Rajam, 2009).

L'hybridation conventionnelle d'agrumes est généralement freinée par beaucoup de facteurs : la grande taille de la plante, les polyembryons nucellaires, l'apomixie, la forte hétérozygotie et la stérilité du pollen ou des ovules. À ces différents problèmes s'ajoutent des cas d'incompatibilités croisées ou d'auto-incompatibilités. La majorité des espèces d'agrumes sont apomictiques, c'est-à-dire que le développement de l'embryon commence directement à partir du tissu nucellaire, supprimant ainsi la croissance de l'embryon zygotique (Koltunow *et al.* 1995). De plus, dans la nature, la multiplication et la culture des agrumes sont limitées à une saison particulière et à des conditions climatiques favorables.

Enfin, les espèces d'agrumes présentent une très longue période juvénile, qui peut aller de 5 à 21 ans pour entrer dans le stade reproduction et donc la production de fruits.

L'évaluation de la qualité des fruits obtenus ne peut donc se faire que très tardivement ce qui amène les agrumiculteurs à prendre des risques économiques conséquents.

Tous ces éléments font que, générer de nouvelles variétés productrices de fruits avec des caractéristiques nouvelles, est un enjeu important pour cette filière. Les techniques basées sur des approches de biotechnologie associées à la culture *in vitro* et la modification génétique peuvent aider à contourner les problèmes liés à la biologie de la reproduction des agrumes (Singh & Rajam, 2009) et à raccourcir les temps de sélection.

### **3.2. La culture *in vitro***

Avec l'apparition des techniques de transgénèse, il est devenu possible de modifier le génome de la plante. Mais pour passer de la dimension cellule transformée à celle d'une plante entière il est nécessaire de disposer d'un système de culture tissulaire optimisé car la régénération est un processus lent et complexe chez les agrumes (Singh & Rajam, 2009). Différentes méthodes de régénération ont été décrites pour différentes espèces de Citrus. On peut ainsi partir de segments de tige ou d'épicotyle (Bordón, Guardiola, et García-Luis 2000 ; Moreira-Dias *et al.* 2001 ; Moreira-Dias *et al.* 2000 ; Zou *et al.* 2008), d'ovules, de stigmates, de style (Carimi, 2005), d'anthères (Chiancone & Germanà, 2016) ou encore de pollen (Hidaka 1979). La régénération d'agrumes peut également être réalisée à partir des nœuds et des entre-nœuds de plantules ayant germé *in vitro* (Usman *et al.* 2005). Enfin, comme pour toute culture *in vitro* de tissus végétaux, l'impact des phytohormones est essentiel (Almeida *et al.* 2002 ; Al-Khayri *et Al-Bahrany* 2001 ; García-luis *et al.* 1999 ; García-Luis *et al.* 2006 ; Moreira-Dias *et al.* 2001 ; Ghorbel, Navarro, et Duran-Vila 1998 ; Hassanein et Azooz 2003)

Parmi les approches de culture *in vitro* d'agrumes, celle faisant appel à de l'embryogenèse somatique semble être particulièrement intéressante. La différenciation des cellules somatiques en embryons présente des similitudes avec les stades de développement de la genèse de l'embryon zygotique (Ahmad A. Omar *et al.*, 2016). L'embryogenèse somatique peut être induite directement dans des nucelles en culture et dans des ovules non développés (Gmitter et Moore 1986) ou indirectement *via* la formation de cals (Kayim et Koc 2006 ; Tomaz *et al.* 2001). Chez les agrumes, la production de lignées de cals embryogènes a été décrite à partir de nucelles excisés, d'ovules abortifs, d'ovules non fécondés, d'ovules non développés, d'embryons nucellaires isolés (Ahmad A. Omar *et al.*, 2016). Le potentiel embryogène des agrumes varie selon le génotype et le type d'explant.

Une application importante de cette technique concerne la production de plantes d'agrumes sans virus par la genèse d'embryons somatiques à partir d'ovules non développés de certaines espèces d'agrumes (Bitters *et al.* 1972 ; Chamandoosti 2017). Des embryons somatiques, des cals embryogènes et des cultures de cellules récupérées à partir d'ovules cultivés *in vitro* ont également été utilisés pour développer des stratégies de cryoconservation de matériel génétique (Thorpe & Yeung, 2011), pour générer des variations somaclonales (Khan, 2007) et pour les technologies de fusion de protoplastes afin de générer des hybrides somatiques (Jude W. Grosser et Gmitter 1990, 2011a ; Jude W. Grosser, Chandler, et Duncan 2007 ; Ahmad A. Omar *et al.* 2016). Les cals peuvent ensuite être orientés vers de l'embryogenèse en remplaçant le saccharose par d'autres sources de carbone (Jude W. Grosser et Gmitter 1990 ; Ahmad A. Omar *et al.* 2016).

Les méthodes d'isolement et de culture de protoplastes de Citrus à partir de cultures de cals embryogènes et de cultures en suspension, ainsi que de la régénération ultérieure des plantes représente une troisième approche envisageable. De nombreux travaux indiquent qu'une régénération est possible à partir de protoplastes préparés à partir des cals embryogènes dérivés des tissus nucellaires (Kobayashi, Uchimiya, et Ikeda 1983 ; Vardi, Spiegel-Roy, et Galun 1982 ; Jude W. Grosser et Gmitter 1990 ; Jude W. Grosser, Čalović, et Louzada 2010 ; Jude W. Grosser et Gmitter 2011a ; Ahmad A. Omar *et al.* 2016).

### **3.2.1. Hybridation somatique**

Les progrès de la culture *in vitro* offrent également des possibilités de créer de nouveaux cultivars d'agrumes. En effet, certaines de ces technologies permettent de dépasser les limites de l'hybridation sexuelle et de contourner la polyembryonie ou la stérilité du pollen et des ovules (Singh & Rajam, 2009). C'est le cas de l'hybridation somatique par fusion de protoplastes qui permet de générer des combinaisons de génomes ce qui n'était pas possible à cause de la stérilité ou de l'incompatibilité sexuelle (Jude W. Grosser et Gmitter 1990 ; Ahmad A. Omar *et al.* 2016 ; Bassene *et al.* 2009). Cette méthode représente un moyen d'augmenter la diversité génétique en combinant différents génomes nucléaires, chloroplastiques et mitochondriaux (Singh & Rajam, 2009). Cette technique offre plusieurs applications utiles pour le développement et l'amélioration des cultivars résistants aux maladies ou à la sécheresse, par exemple (Grosser et Gmitter 1990, 2011a ; Omar *et al.* 2016). Elle est devenue une partie intégrante de l'amélioration des variétés d'agrumes.

Cette hybridation peut être réalisée sur des protoplastes par électrofusion ou par fusion chimique en présence de polyéthylène glycol (PEG). La caractérisation des plantules régénérées peut être réalisée par des approches de cytométrie en flux ou par l'utilisation

de marqueurs moléculaires (Grosser, Ollitrault, et Olivares-Fuster 2000 ; Grosser et Gmitter 2011b ; Dambier *et al.* 2011). Cette approche a été utilisée pour générer des hybrides somatiques à partir de plus de 500 combinaisons parentales, dont plus de 300 ont été réalisées dans le laboratoire de Grosser et Gmitter en Floride (Omar *et al.* 2016). En tant que sous-produit de la fusion de protoplastes, des centaines de plants d'agrumes cybrides (hybrides cytoplasmiques) diploïdes ont également été régénérés par embryogenèse somatique (Grosser *et al.* 1996 ; Guo et Yamazoe 2004).

### **3.3. La transgénèse chez les agrumes**

La transformation génétique est devenue une méthode alternative pour l'amélioration des espèces de plantes, notamment les agrumes, car il est possible de maintenir l'intégrité du cultivar tout en ajoutant un seul trait. Les premiers articles traitant de transformation génétique d'agrumes ont été publiés il y a plus de trois décennies (Kobayashi *et al.*, 1983). Parmi les différentes techniques de transformation utilisées dans les agrumes, il y a la transformation médiée par *Agrobacterium* (Singh & Rajam, 2009) et la transformation de protoplastes (Fleming *et al.* 2000 ; Niedz, McKendree, et Shatters 2003). Le bombardement de tissus végétaux avec des particules enrobées d'ADN (H. Wu, Acanda, Jia, Wang, & Zale, 2016) est également décrit mais moins utilisé.

#### **3.3.1. Utilisation d'*Agrobacterium tumefaciens***

Le procédé le plus fréquemment utilisé pour générer des agrumes transgéniques fait appel à la transformation d'explants prélevés à partir de jeunes plants et plus particulièrement des plantules nucellaires. Cette méthode fonctionne mieux avec les cultivars polyembryonnaires et utilise l'organogenèse comme voie de régénération. Comme de nombreux cultivars d'agrumes ne contiennent que très peu voire pas de pépins, il n'est pas facile d'obtenir des explants à partir de semis nucellaires (Omar *et al.* 2016). Un protocole faisant appel à des tissus matures prélevés sur des branches d'arbres fruitiers a également été décrit. Pour cette méthode, plusieurs étapes sont nécessaires pour arriver à des pousses transgéniques microgreffées *in vitro* sur des porte-greffes. Cette méthode permet d'avoir, après adaptation de la plante, les premiers fruits après environ 12 à 15 mois. Une limite liée à cette technique concerne la faible sensibilité à l'infection par *Agrobacterium* et une régénération inefficace des plantes *via* l'organogenèse pour certaines variétés. En 2017, Zhang *et al.* ont développé un protocole de transformation de pamplemousse par *Agrobacterium in planta*.

#### **3.3.2. Transformation de protoplastes**

Les protoplastes se sont révélés être très utiles dans la transformation génétique des plantes. En partant d'embryon somatique, les agrumes peuvent être transformés soit directement à partir de cultures de cellules embryogènes en suspensions, soit indirectement à partir de protoplastes isolés. Les protoplastes d'agrumes sont généralement transformés en utilisant du PEG ou par électroporation (Niedz, McKendree, et Shatters 2003 ; Fleming *et al.* 2000 ; Grosser et Gmitter 1990, 2011a ; Omar, Song, et Grosser 2007). La transformation de protoplastes permet la régénération d'une plante à partir d'une cellule par la voie de l'embryogenèse somatique plutôt que par l'organogenèse. Cette méthode est dépendante de l'efficacité de transformation, de la toxicité pour les cellules, de la facilité d'utilisation, du coût et de la disponibilité des matériaux. Un autre aspect important concerne la sélection des cellules transformées. L'utilisation de gènes rapporteurs codant pour des protéines fluorescentes paraît être une solution (Ahmad A. Omar *et al.*, 2016).

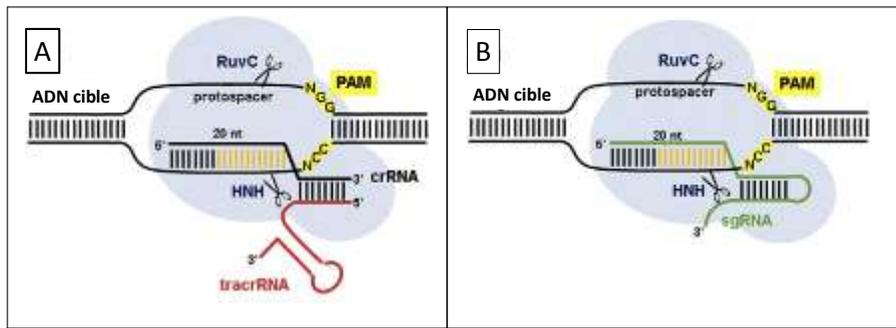
#### **4. Vers l'édition du génome du pomelo**

L'obtention de pomelos ne produisant plus de furocoumarines a fait l'objet d'un certain nombre de travaux au cours des dernières années. Certaines variétés ont ainsi été obtenues par des approches de sélection variétale classique. Par exemple, une équipe israélienne décrit l'obtention des variétés sans pépins « Aliza » et « Coocki » par rétrocroisements de *C. maxima* et *C. reticulata*. Ces variétés conservent leur teneur en flavonoïdes (et donc leurs propriétés antioxydantes) mais produisent très peu de furocoumarines (Fidel *et al.*, 2016). L'équipe de Fred Gmitter de l'Université de Floride a également produit une variété de pomelo produisant 10 fois moins de furocoumarines qu'une variété classique. Cette variété a été obtenue grâce à des mutations somatiques d'un hybride de *C. paradisi* et *C. maxima* (US PP26,177 P3, Gmitter, 2015). Les traits commercialement intéressants n'ont cependant pas encore été confirmés. Cette même équipe a également décrit la variété de pomelo « Low acid Foster », qui présente des teneurs réduites en furocoumarines par rapport à la variété originale « Foster » (Chen *et al.*, 2014).

##### **4.1. L'édition de génome par des ciseaux moléculaires**

Au cours de ces dernières années sont apparus un certain nombre d'outils permettant de faire de la mutagenèse ciblée dans le génome de plantes. Ces outils ont énormément évolué en très peu de temps passant par des nucléases à doigt de zinc (ZFN), des nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN) et, plus récemment des endonucléases bactériennes qui sont à l'origine du système CRISPR/Cas9 (Hsu, Lander, & Zhang, 2014; Jinek *et al.*, 2012).

Dans ce dernier système, l'endonucléase Cas9 est dirigée par un ARN guide très court d'une vingtaine de nucléotides spécifique et complémentaire de l'ADN cible. Chez les bactéries, ces guides de petite taille correspondent généralement à des séquences de phages et permettent la mise en place d'un système de défense antiviral très efficace. Cet ARN guide (ARNr) s'associe dans un hétéroduplex avec un ARN CRISPR trans-activant (tracrARN) qui stabilise la structure et active Cas9 pour couper l'ADN cible (protospacer). Un motif « protospacer-adjacent » (PAM) se situe directement en aval de l'ADN cible et constitue une condition préalable au clivage de l'ADN par la nucléase. Ce système a été détourné pour réaliser de l'édition ciblée de génome (Figure 9) (Bortesi & Fischer, 2015; Cong et al., 2013; Hsu et al., 2014; Mali et al., 2013).



**Figure 9. Coupure ciblée de l'ADN par Cas9.**

(A) Dans le système natif, la protéine Cas9 (bleu clair) est guidée par une structure formée par un ARN CRISPR (crRNA, en noir), qui contient un segment de 20 nt déterminant la spécificité de la cible et un ARN CRISPR trans-activant (tracrRNA, en rouge), qui stabilise la structure et active Cas9 pour cliver l'ADN cible. La présence d'un motif adjacent NGG (PAM, en jaune) directement en aval de l'ADN cible, est une condition préalable au clivage de l'ADN par Cas9. Parmi les 20 nucléotides d'ARN déterminant la spécificité de la cible, la séquence de 12 nt (en orange) en amont de la PAM serait particulièrement importante pour l'appariement entre l'ARN et l'ADN cible. (B) Cas9 peut être reprogrammé pour cliver l'ADN par une seule molécule d'ARN guide (sgRNA, en vert), une chimère générée en fusionnant l'extrémité 3' de l'crRNA à l'extrémité 5' du tracrRNA. Source : (Bortesi & Fischer, 2015).

Le système CRISPR/Cas9 génère une coupure double brin qui est réparée par une jonction non homologe (NHEJ). Par ce moyen, le mécanisme de réparation de l'ADN peut produire des insertions/délétions, menant éventuellement à des mutations par décalage du cadre de lecture des bases et à la non fonctionnalité des gènes coupés. Cet outil peut également être utilisé pour insérer un morceau d'ADN exogène à un endroit précis du génome. Pour cela une matrice d'une séquence spécifique peut être fournie et la réparation du génome peut être réalisée par recombinaison homologe (Hsu et al., 2014).

La redondance génique peut représenter un frein à l'utilisation de la transgénèse ciblée. Un problème majeur est que le séquençage complet de nombreux génomes n'a pas encore été réalisé. Néanmoins, la méthode CRISPR/Cas9 a déjà été utilisée pour l'édition de génomes de différentes plantes (Bortesi & Fischer, 2015; Collonnier et al., 2017; Feng et al., 2013; Gao et al., 2015; Jiang et al., 2013; Korotkova, Gerasimova, & Khlestkina, 2019; Lin et

al., 2018; Miao et al., 2013; Semenova, Nagornykh, Pyatnitskiy, Artamonova, & Severinov, 2009; Xing et al., 2014; T. Xu et al., 2015).

#### **4.2. CRISPR/Cas9 chez les agrumes**

Trois études différentes font état de l'utilisation d'une approche CRISPR/Cas9 chez les agrumes (Jia, Orbovic, Jones, & Wang, 2016; Jia & Wang, 2014; Jia, Zhang, et al., 2017). En 2014, Jia et ses collaborateurs ont développé une technique d'agro-infiltration pour augmenter l'expression transitoire de protéines dans des agrumes. Pour rendre les cellules des feuilles d'oranger plus susceptibles à la transformation par *A. tumefaciens*, ils inoculent d'abord les feuilles avec *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc). En utilisant cette approche, ils ont transformé des feuilles d'orange douce avec CRISPR en ciblant le gène de la phytoène desaturase (*CsPDS*), un gène généralement utilisé comme rapporteur car en l'inactivant on génère des plantes avec un phénotype albinos (M. Wang, Wang, Ji, & Wang, 2009). Dans cette étude, la modification a été confirmée par séquençage de produits de PCR et le taux de mutation des cellules obtenues a été estimé de 3,2 à 3,9 %. En 2016, ces mêmes auteurs ont généré par agro infiltration d'épicotyles des plantes transgéniques de pomelo var. Duncan et d'orange douce pour cibler le promoteur du gène « *Citrus sinensis Lateral Organ Boundaries* » (*CsLOB1*) avec CRISPR/Cas9. Ce gène est surexprimé lorsque les symptômes de la maladie du chancre bactérien des *Citrus* (Citrus-canker) se développe chez les agrumes. Par cette approche, les auteurs ont généré quatre variétés éditées avec des efficacités de transformation allant de 14 % à 81 %, et ayant plusieurs mutations induites par Cas9 de manière aléatoire dans la même plante. Parmi ces variétés, deux n'ont pas développé de symptômes similaires à une plante sauvage infectée par le chancre. Cela est expliqué par l'insertion de 1 pb par le facteur de transcription qui reconnaît le promoteur du *CsLOB1*, néanmoins s'il y a 2 ou 3 bp insérés il n'y a plus d'interaction avec le promoteur. En 2017, ces auteurs ont ciblé le gène *CsLOB1* et non le promoteur et ont généré 6 lignées mutantes, dont 2 n'ont pas présenté de symptômes.

D'autres travaux visant à optimiser la technique CRISPR/Cas9 chez les *Citrus* ont été développés. En 2017, Jia et ses collaborateurs ont modifié la séquence codante de Cas9 (Jia, Xu, et al., 2017). Ils ont prouvé qu'il était possible d'utiliser l'enzyme de *Streptococcus aureus* (SaCas9), au lieu de celle de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9, la plus utilisée). SaCas9 est plus petite et reconnaît une autre séquence PAM. Dans ce cas, le taux de mutation des plantes transgéniques était entre 15 % et 79 % (au lieu de 14-81 % dans l'étude précédente). Les auteurs affirment qu'il est envisageable d'utiliser de manière simultanée SaCas9 et SpCas9 pour cibler des endroits différents dans de futures expériences. D'autres travaux réalisés par Zhang *et al.* en 2017, ont montré que l'utilisation du promoteur YAO de *A.*

*thaliana* peut améliorer les rendements de transformation avec SpCas9 en utilisant le même sgRNA cible que Jia et Wang (2014). Ils ont obtenu jusqu'à 75% d'efficacité de transformation par expression transitoire de la Cas9, par rapport aux 3,2 à 3,9%.

## **Objectifs de la thèse**

Comme cela a été évoqué à plusieurs reprises dans la partie bibliographique de ce manuscrit, les furocoumarines ont été décrites comme étant des molécules avec des propriétés physico-chimiques remarquables. Il a aussi été démontré que ces molécules étaient à l'origine de surdosages médicamenteux connus sous le nom d'effet pomelo. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse ayant comme objectif la mise en place d'outils de mutagenèse ciblée pour inhiber la production des furocoumarines dans le pomelo. L'enjeu principal de ce projet est l'obtention de nouvelles variétés d'agrumes ne produisant plus de furocoumarines.

Pour atteindre cet objectif, nous avons choisi d'utiliser des outils d'édition de génome CRISPR/Cas9 et de culture *in vitro* de protoplastes d'agrumes. La stratégie générale mise en œuvre consiste à transformer génétiquement des cellules isolées puis de régénérer des plantes entières à partir de ces cellules transformées. Cette approche permet ainsi de s'affranchir de plantes chimères et de n'avoir que des plantes génétiquement homogènes.

Ainsi, la première partie de ce manuscrit concerne les méthodes mises en œuvre pour cultiver *in vitro* les cals ou des cellules d'un pomelo en particulier (le pomelo « Star Ruby »), pour préparer des protoplastes à partir de ces cellules dans le but de les transformer par une approche d'électroporation.

Dans la seconde partie de cette thèse, je décrirai la stratégie mise en place pour éditer le génome en identifiant et en ciblant une prényltransférase impliquée dans les étapes précoces de la synthèse des furocoumarines.

Ces deux premières parties du travail ont été réalisées dans le cadre d'une démarche de valorisation. Le projet NoFuroc fait suite à une demande de Brevet de l'Université de Lorraine et du Laboratoire et Agronomie. Il a été financé comme projet de maturation par la SATT SAYENS.

Dans une troisième partie j'exposerai la stratégie mise en œuvre pour identifier d'autres gènes cibles potentiels impliqués dans la synthèse de ces molécules. L'objectif étant de disposer de plusieurs cibles et ainsi de disposer de plusieurs possibilités pour inhiber la voie de biosynthèse de ces molécules.



# **Chapitre II :**

## **Résultats et discussion**



## **Chapitre II : Résultats et discussion**

### **Partie 1 : Culture *in vitro* de Pomelo Star Ruby**

La première étape de ce travail a consisté à acquérir une maîtrise de la culture *in vitro* du pomelo Star Ruby. Une analyse bibliographique a permis de mettre en évidence que la culture *in vitro* et la transformation de n'importe quelle plante nécessitait un travail d'optimisation préalable. Dans le cas des agrumes, de nombreux travaux étaient déjà disponibles. Malheureusement aucun ne concernait la variété Star Ruby et nous savons que les mécanismes de régénération peuvent différer fortement même entre les variétés. Ce chapitre est dédié à la mise en place des approches nécessaires pour mettre en œuvre la transformation génétique de cette plante. Il est subdivisé en 3 grandes parties :

- 1) Culture *in vitro* de cals et préparation de protoplastes par digestion enzymatique
- 2) Mise au point de la transformation de protoplastes par électroporation
- 3) Mise en culture de protoplastes en vue de la régénération de plantes.

#### **1. Culture *in vitro* et préparation de protoplastes de Pomelo variété *Star Ruby***

##### **1.1. Cals embryogéniques de pomelo *Star Ruby* et isolement de protoplastes**

###### **1.1.1. Culture de cals**

Pour réaliser ce travail nous avons effectué l'intégralité de nos expérimentations sur du matériel génétique que Dominique Dambier (AGAP – Montpellier) a fourni sous la forme de cals embryogéniques issus du tissu nucellaire de Pomelo Star Ruby. Afin d'avoir des résultats reproductibles dans le temps, la première étape a consisté à cultiver les lignées de cals durablement en les repiquant toutes les 5 à 7 semaines sur un milieu adapté. Deux milieux de cultures ont été utilisés : le milieu Murashige et Tucker (MT) et le milieu Half and Half (H+H). Le milieu MT dérive du milieu MS classiquement utilisé en culture *in vitro*. Il a été utilisé pour la culture et la propagation de différentes espèces d'agrumes (Murashige & Tucker, 1969). Le milieu H+H est quant à lui classiquement utilisé pour la culture de cellules embryogéniques en suspension (Ahmad A. Omar et al., 2016) (Figure 10). Les deux milieux, de composition différente (disponible dans le chapitre matériel et méthode de ce manuscrit), ont un impact sur la structure et la friabilité des cals.

En partant du matériel initialement fourni, 24 lignées cellulaires ont été générées et annotées de A à X à partir des cals originels fournis par D. Dambier.



**Figure 10. Cals embryogéniques de *C. paradisi* (pomelo) var. Star Ruby.**  
En milieu MT (gauche) et Half and Half (droite)

### 1.1.2. Préparation de protoplastes

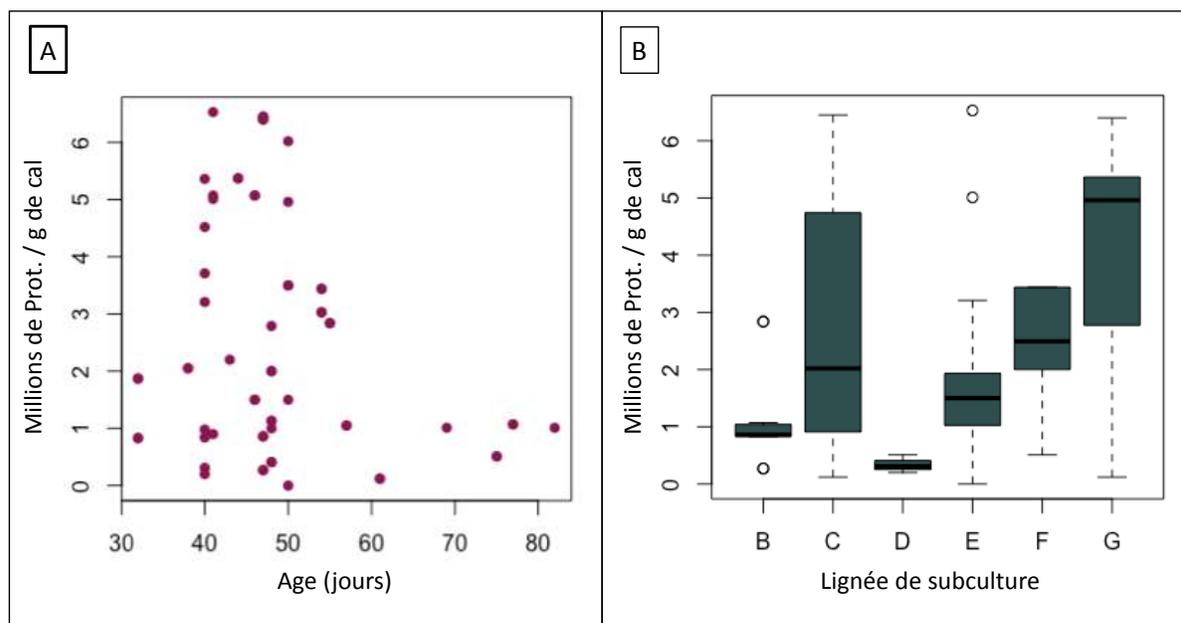
La préparation de protoplastes à partir de tissus d'agrumes a été largement décrite comme indiqué dans l'introduction de ce manuscrit. Pour ce travail, la solution enzymatique utilisée est composée de 1 % de Cellulase RS, 1 % de Macerozyme R-10 et 0,2 % de Pectolyase Y-23. Les cals sont incubés dans ce cocktail enzymatique pendant 24h avec une agitation légère. Les protoplastes générés sont purifiés sur un gradient de saccharose-mannitol.

Afin d'obtenir des rendements reproductibles et des protoplastes de bonne qualité, des cals prélevés 32 à 77 jours après repiquage ont été testés. Les résultats obtenus sur une quarantaine de préparations indépendantes mettent en évidence des rendements extrêmement variables allant de 0 à plus de  $7 \times 10^6$  protoplastes / g de cal (Figure 11A). On constate cependant que ce rendement est fortement diminué pour des cals de plus 57 jours. Dans la mesure où les cals commencent à avoir une taille relativement importante à ce stade, il est possible que les cellules ne soient plus dans des conditions physiologiques appropriées pour permettre un isolement efficace de protoplastes.

Il est bien connu que la culture de tissus végétaux et leurs repiquages successifs peut mener à des modifications génétiques somaclonales. Pour tenter d'expliquer la variabilité de production de protoplastes pour des prélèvements réalisés sur des cals âgés de 3 à 5 semaines après repiquage, des expérimentations ont été réalisées en prenant garde de tracer les lignées cellulaires utilisées. De cette manière, les résultats obtenus montrent que seules 6 des 24 lignées permettent d'obtenir des protoplastes de manière reproductible (Figure 11B) mais avec des rendements, là encore, très variables allant de 0,1 à  $6 \times 10^6$  protoplastes / g de cal. Parmi ces 6 lignées, les lignées C et G sont celles qui ont donné des

rendements maximaux. A noter aussi que les 18 autres lignées (A et H à X) n'ont jamais permis de générer des protoplastes.

Dans leurs travaux, Omar et ses collaborateurs, indiquent que la production de protoplastes est améliorée en utilisant des cals friables qui contiennent des quantités basses d'amidon. Cette teneur en amidon peut être réduite en cultivant les cals sur un milieu contenant de la glutamine, ce qui est le cas du milieu H+H (Ahmad A. Omar et al., 2016). En utilisant cette approche, nos résultats n'ont cependant pas permis de montrer une amélioration de la production de protoplastes. Elle n'a pas permis non plus de rendre « productrice » une lignée cellulaire qui ne l'était pas.



**Figure 11. Rendements de production de protoplastes à partir des cals cultivés sur milieu solide.** Production de protoplastes en fonction de l'âge des cals (A) et en fonction de la lignée cellulaire utilisée (B).

### 1.1.3. Culture cellulaire et production de protoplastes

Face à ces résultats très fluctuant pour la préparation de protoplastes à partir de cals, une approche alternative a été envisagée basée sur le fait que les cals sont des amas cellulaires plus ou moins compacts. Il est envisageable que les cellules localisées au centre de ces cals ne soient pas accessibles facilement aux enzymes.

L'alternative envisagée à l'utilisation de cals cultivés sur milieu solide a été d'utiliser des cultures en suspension. En effet, les cellules isolées devraient être plus accessibles aux enzymes. Par ailleurs, ces cellules sont en constante division et possèdent des parois cellulaires très fines plus facilement digérables avec la même concentration d'enzyme. Ce dernier point va dans le sens des commentaires d'Omar et de ses collaborateurs qui notent

que les cals doivent être en phase de croissance logarithmique au moment de l'isolement (Omar *et al.* 2016).

Pour générer des cultures cellulaires, 3 mL de préculture de milieu H+H ont été ensemencés avec 150 mg de cal de la lignée B et G. La montée en échelle des cultures (Tableau 1) a été initiée après 5 jours de culture : les différentes précultures (6 en tout) ont été utilisées pour ensemencer 10 mL de milieu dans des flacons de culture de 50 mL. Finalement, après 7 jours de culture supplémentaire, 10 mL de milieu H+H ont été ajoutés et les cultures transférées dans des Erlenmeyer de 100 mL. C'est à partir de cette culture que les protoplastes ont été préparés.

|                                  | <i>Jour 0</i>    | <i>Jour 5</i> | <i>Jour 12</i> |
|----------------------------------|------------------|---------------|----------------|
| <i>Volume de MT 0.15M</i>        | 3 mL             | 10 mL         | 20 mL          |
| <i>Masse cellulaire initiale</i> | 150 mg           | -             | 1 g            |
| <i>Concentration initiale</i>    | 0,05 g/mL        | -             | 0,05 g/mL      |
| <i>Masse cellulaire finale</i>   | -                | 0,4-1 g       | 4-6 g          |
| <i>Concentration finale</i>      | -                | 0,04-01 g/mL  | 0,2-0,3 g/mL   |
| <i>Contenant (1:5)</i>           | plaque à 6 puits | Erlen 50 mL   | Erlen 100 mL   |

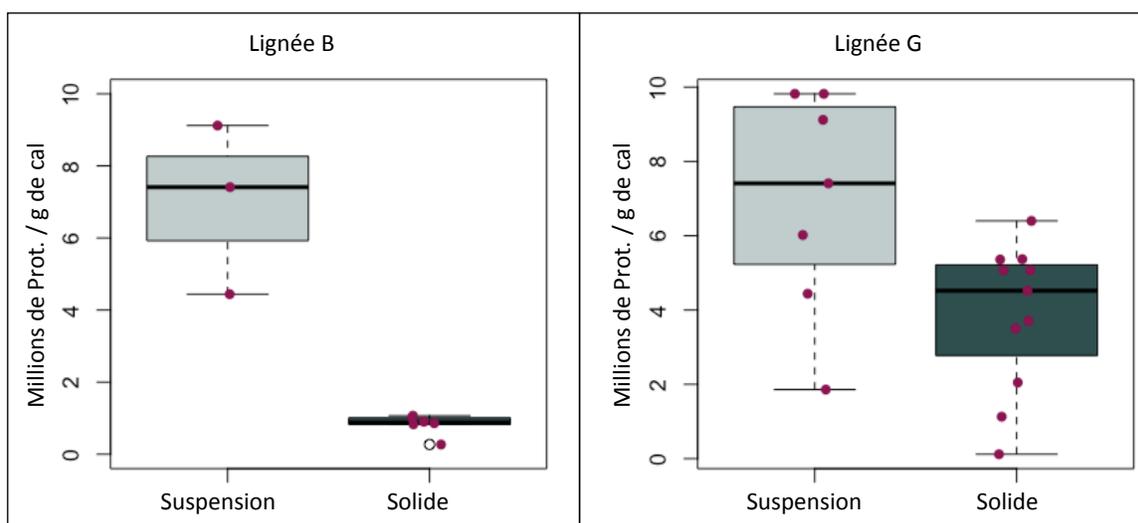
**Tableau 1. Méthodologie de culture des cals de pomelo Star Ruby en milieu liquide H+H.**

Pour vérifier qu'une approche de culture de cals en suspension était plus appropriée que l'utilisation de cals en milieu solide pour la production de protoplastes, il a été d'une part identifié le stade de croissance cellulaire le mieux adapté et d'autre part vérifié que ce stade permettait d'avoir un rendement supérieur à celui obtenu à partir de cals.

**Stade de croissance :** Selon Omar *et al.*, (2013) les cultures sont plus actives et en division accélérée entre 4 et 15 jours. En se basant sur cette étude, les préparations de protoplastes ont été réalisées dans la phase initiale de croissance (à 4 jours) et dans une phase un peu plus tardive (11 jours). Les résultats préliminaires obtenus indiquent que le rendement en nombre de protoplastes / g de cals est 2,5 fois supérieur sur des cellules prélevées en phase tardive (de 3 à 7,5 millions de protoplastes / g de cal).

**Comparaison culture en suspension et cals en milieu solide :** Cette comparaison a été réalisée à partir des cultures liquides des lignées B et G (ayant un rendement de production de protoplastes plus ou moins élevé) de 11 +/- 1 jours et des cals cultivés en milieu solide 35 +/- 5 jours. La biomasse de cellules prélevée pour l'isolement de protoplastes a été de 1 g à 1,5 g. Les résultats obtenus indiquent clairement que la production de protoplastes à partir de cultures en milieu liquide est, en moyenne, plus

élevée (jusqu'à  $1 \times 10^7$  protoplastes / g de biomasse) par rapport celle obtenue à partir de cals (maximum  $7 \times 10^6$  protoplastes / g de biomasse). De manière intéressante, cette approche permet de préparer des protoplastes aussi bien à partir de la lignée cellulaire de cal faiblement productrice B qu'à partir de la lignée de cal fortement productrice G. Cependant, comme pour la préparation de protoplastes à partir des cals cultivés en milieu solide, il reste une très grande variabilité d'une expérimentation à l'autre (Figure 12).



**Figure 12. Rendements de production de protoplastes selon le type de culture.**

Production de protoplastes en fonction du type de culture (A) et en fonction de la quantité de cal digéré dans 4 mL de solution enzymatique (B).

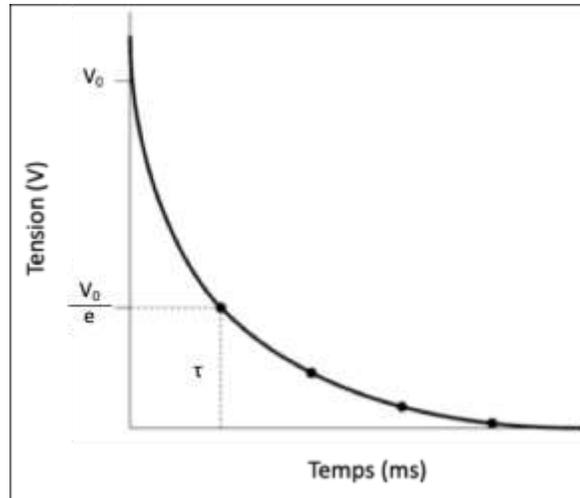
**En conclusion**, cette première partie a permis de définir des conditions de préparation de protoplastes par digestion enzymatique à partir de culture de cellules en suspension de Pomelo Star Ruby cultivées pendant 11 jours. Les rendements obtenus sont supérieurs à ceux obtenus à partir de cals en milieu solide. La masse de cellules nécessaire, est obtenue plus rapidement si on la compare avec la culture sur milieu solide (11 jours au lieu de 30 jours). Les risques de contaminations sont moins importants. Ainsi, bien que non reproductible, cette approche a permis de disposer rapidement de suffisamment de matériel pour mettre au point une méthode de transformation efficace pour la suite de ce projet.

## 2. Transformation de protoplastes de Pomelo Star Ruby par une approche d'électroporation

### 2.1. Théorie de l'électroporation.

En 2003, Niedz et ses collaborateurs ont mis au point l'électroporation de protoplastes de *C. sinensis* (Niedz et al., 2003). A partir de ces résultats, nous avons adapté le protocole pour l'électroporation de protoplastes de pomelo Star Ruby.

L'électroporation consiste à appliquer un choc électrique par décharge d'un condensateur (décroissance exponentielle) sur des cellules présentes dans une solution ayant une résistance spécifique (**R**) Figure 13.



**Figure 13. Courbe de décroissance exponentielle d'un choc électrique par décharge d'un condensateur.**

Quand le condensateur chargé à une tension initiale  $V_0$  est déchargé vers les cellules, la tension appliquée sur les cellules diminue dans le temps. Donc à  $t = \tau$ , la tension appliquée est égale à  $V_0 / e$  de la valeur initiale.

Les deux paramètres importants pour que cette électroporation soit efficace et non délétère pour les cellules sont :

- 1) le temps caractéristique  $\tau$ , qui détermine la durée pendant laquelle la plus grande partie de l'énergie sera délivrée à la suspension cellulaire :  $\tau = R_p \cdot C$  où  $R_p$  est la résistance de la solution et  $C$  la capacité de l'électroporateur.
- 2) le champ électrique **E** appliqué à cette solution. Ce champ électrique peut être déterminé avec la formule  $E = V_0 / d$  où  $V_0$  est la tension initiale appliquée et  $d$  la largeur de la cuve d'électroporation.

## **2.2. Détermination théorique des conditions initiales : adaptation des conditions d'électroporation aux protoplastes de la variété Star Ruby.**

Afin de reproduire les conditions expérimentales décrites par Niedz et ses collaborateurs, nous avons utilisé une tension de 150 à 180 V pour des cuves ayant des

électrodes séparées de  $d = 4$  mm (i.e. champ électrique compris entre 375 et 450 V cm<sup>-1</sup>). Concernant le temps caractéristique  $\tau$ , Niedz *et al* ont montré que la valeur optimale était 70 à 80 ms. Ce paramètre est important car il peut affecter l'efficacité de transformation. L'électroporateur disponible au laboratoire (Gene Pulser Xcell, Bio Rad) permet de programmer une résistance  $R_m = 100 \Omega$  et  $C=950 \mu\text{F}$ . Ces valeurs permettent de bénéficier d'un temps caractéristique  $\tau$  de 75,45 ms. L'intégralité des calculs réalisés pour adapter le protocole de Niedz *et al* se trouve en Annexe 2.

Afin de déterminer la quantité de plasmides nécessaire pour réaliser une transformation efficace, des expériences préliminaires ont été réalisées en utilisant un plasmide proche des plasmides utilisés ultérieurement et contenant un gène rapporteur : le plasmide pCAS9-DsRed. Il permet de produire la protéine fluorescence DsRed qui émet un signal de fluorescence dans le rouge à 583 nm. En me basant encore une fois sur les travaux de Niedz, la quantité de plasmide par transformation a été fixée à 50  $\mu\text{g}$  pour un volume de 10  $\mu\text{L}$ .

Pour finir, le mélange d'électroporation a été complété avec 5  $\mu\text{L}$  (soit 50  $\mu\text{g}$ ) de DNA carrier (DNA de sperme de Saumon à 10 mg/ml) et les protoplastes ont été soumis à un choc thermique de 5 min à 45 °C avant l'électroporation.

**En résumé**, les conditions de bases **théoriques** mises en œuvre sont :

- Cuve d'électroporation de 4 mm
- 500  $\mu\text{L}$  de suspension de protoplastes à une densité  $1 \times 10^6$  des cellules / mL le tampon HEPES 10 mM ; 0,7 mM Mannitol ; pH 8,0.
- Pour atteindre  $\tau = 70$  à 80 ms :
  - Capacité : 950  $\mu\text{F}$
  - Résistance : 100  $\Omega$
  - Tension de : 150 à 180 V
- Plasmide pCAS-dsRed : plus de 50  $\mu\text{g}$  ; 10  $\mu\text{L}$  ajoutés
- ADN de sperme de saumon à 50  $\mu\text{g}$  ; 10  $\mu\text{L}$  ajoutés
- Choc thermique : 45 °C pendant 5 min avant électroporation

### 2.3. Amélioration des conditions d'électroporation de protoplastes

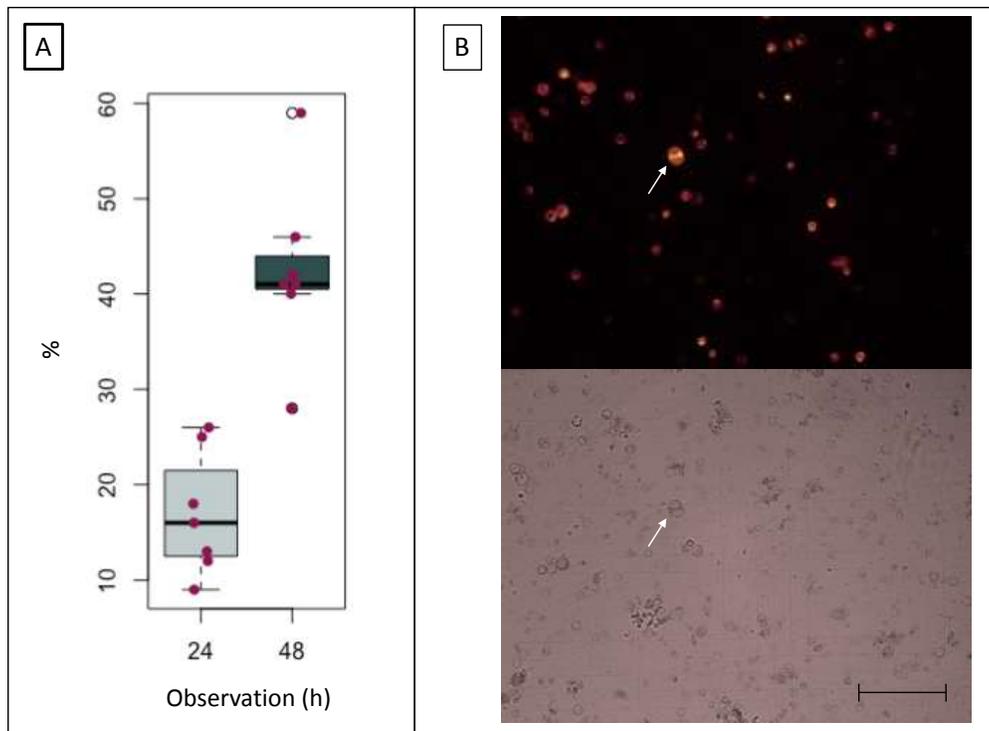
#### 2.3.1. Expression de la protéine DsRed

Pour définir le temps nécessaire à la production de protéines et ainsi avoir un test visuel du taux de transformation. La purification de protoplastes a été réalisé comme

décrite précédemment et entre 30 min et 2 h plus tard au maximum, la transformation a été réalisée selon les conditions résumées dans la section précédente. Les protoplastes ont été observés 24 h et 48 h après électroporation. Pour mon travail, j'ai calculé la fréquence de transformation relative, selon Mathur et Koncz (1998), avec la formule suivante :

$$\text{Fréquence de transformation relative} = \frac{\text{Protoplastes fluorescentes}}{\text{Protoplastes totaux sous la lumière blanche}} \times 100 \%$$

Les observations réalisées 24 h post-transformation indiquent un nombre de cellules rouges beaucoup moins important qu'au bout de 48 h post-transformation (Figure 14). Ce résultat est cohérent avec des résultats d'expression transitoires obtenus sur des feuilles de plantes qui montrent que les protéines nécessitent un certain temps pour être produites efficacement. J'ai donc retenu l'observation à 48 h pour les expérimentations ultérieures.



**Figure 14. Expression du gène rapporteur DsRed.**

(A) Boîte à moustache présentant la fréquence de transformation relative des protoplastes électroporés avec le vecteur plasmidique pCAS9-DsRed. Les points en rose indiquent des données expérimentales.

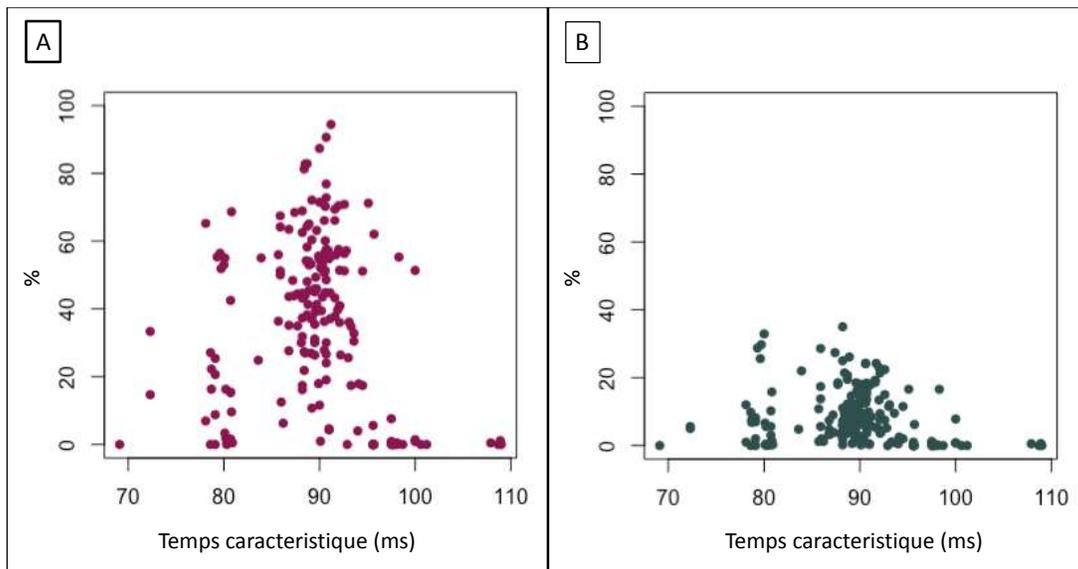
(B) Protoplastes fluorescents 48 h après l'électroporation avec le vecteur contenant le gène codant pour la protéine fluorescente rouge DsRed, visualisés sous UV avec le filtre N2.1 (excitation BP 515–560 ; miroir dichroïque RKP 580 ; barrière du filtre LP 590) (en haut) et sous la lumière blanche (en bas). Une possible division cellulaire, montrant que les protoplastes sont actifs est montré par la flèche blanche. La ligne d'échelle indique 250 μm.

### 2.3.2. Temps caractéristique

Le temps caractéristique ( $\tau$ ) déterminé sur la base des travaux réalisés sur les protoplastes de *C. sinensis* par Niedz est situé entre 70 et 80 ms. Afin de vérifier si ce temps était le mieux adapté aux protoplastes de Star Ruby, la fréquence de transformation relative a été observée entre 70 et 100 ms de temps caractéristique. Les résultats obtenus sur différentes préparations de protoplastes (Figure 15A) mettent en évidence que le  $\tau$  optimal est autour de 90 ms. Pour des valeurs supérieures à 95 ms et inférieures à 80 ms, la fréquence de transformation est très fortement réduite. Au-delà de 100 ms il n'y a plus de fluorescence détectable. Ceci est vraisemblablement lié à une réduction du taux de survie des cellules. Pour mieux comprendre ce taux de survie, j'ai calculé l'efficacité de transformation relative qui prend en compte plutôt la quantité des protoplastes originellement mis en culture après l'électroporation comme indiqué par la formule suivante :

$$\text{Efficacité de Transformation relative} = \frac{\text{Protoplastes Fluorescentes}}{\text{Protoplastes totaux utilisés pour la transformation}} \times 100 \%$$

Ainsi, nous observons la même distribution des données mais plus compacte, car l'efficacité de transformation est fortement affectée par la perte de protoplastes après l'électroporation (Figure 15B).

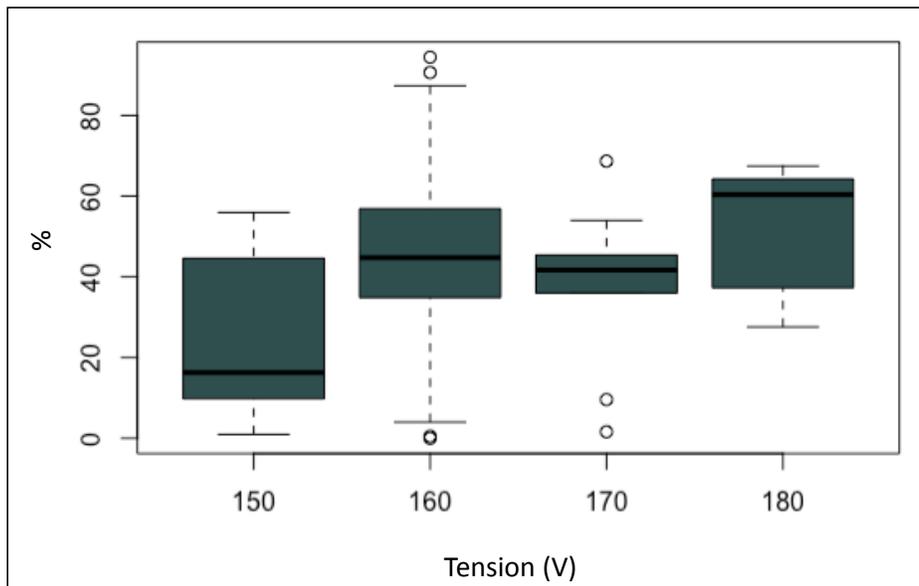


**Figure 15. Influence du temps caractéristique dans la transformation de protoplastes.**  
(A) Dispersion de la fréquence de transformation relative (B) et dispersion de l'efficacité de transformation relative, les deux en fonction du temps caractéristique.

Comme cela a déjà été observé pour le rendement de production des protoplastes lors de leur préparation, on constate une très grande variabilité du nombre des protoplastes transformés. Au meilleur temps caractéristique de 90 ms, la fréquence de transformation relative peut fluctuer de 20 à 90 %. Ces taux peuvent être liés à l'extrême sensibilité de ces cellules aux forces de cisaillement lors des manipulations, aux changements de température des solutions utilisées ainsi qu'aux saisons de l'année.

### 2.3.3. Tension

Les conditions optimales définies par Niedz *et al.* sont comprises entre 150 et 180 V pour une cuve d'électroporation de 4 mm. J'ai testé ces tensions sur différentes préparations de protoplastes et les résultats obtenus montrent que les tensions de 160 à 180 V étaient à peu près équivalentes en termes de transformation. (Figure 16).

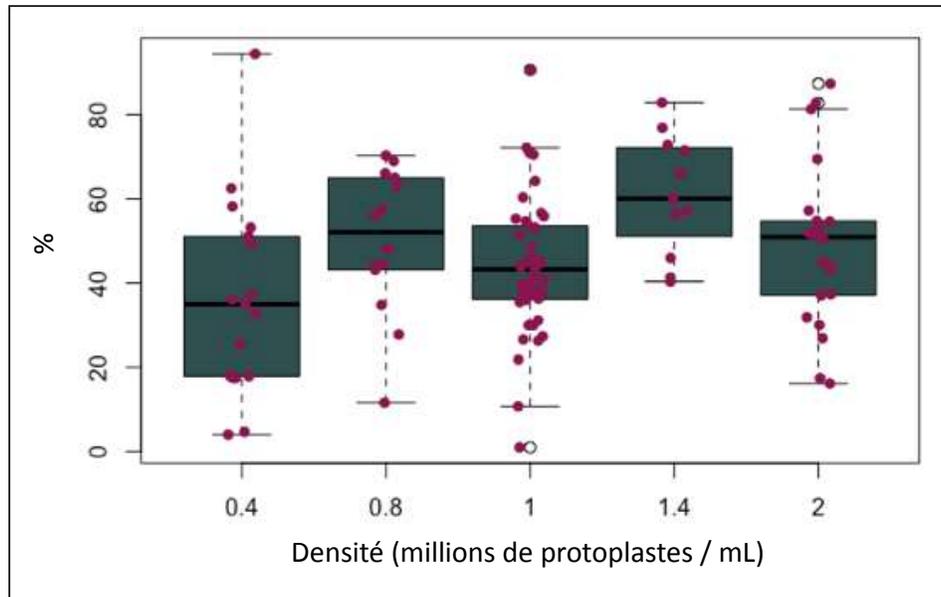


**Figure 16. Influence de la tension dans la transformation de protoplastes.**

Boîte à moustache représentant la fréquence de mutation relative de transformation des protoplastes en fonction de la tension appliquée lors de l'électroporation.

### 2.3.4. Concentration de protoplastes

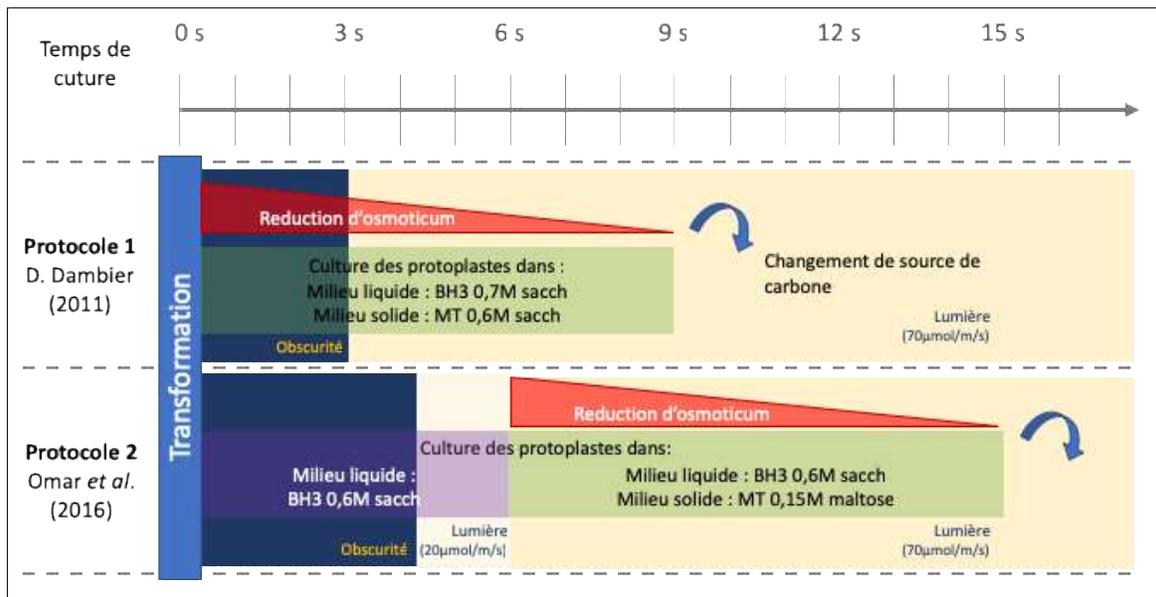
Un dernier paramètre qui semblait important dans la démarche des mises au point d'une méthode de transformation efficace de protoplastes est la densité des cellules en suspension lors de l'électroporation. Basés sur le conseil de D. Dambier, 5 densités différentes ont été testées :  $4 \times 10^5$  ;  $8 \times 10^5$  ;  $10^6$  ;  $1,4 \times 10^6$  et  $2 \times 10^6$  protoplastes / mL. Les résultats que j'ai obtenus n'indiquent pas une différence significative en termes d'efficacité de transformation (Figure 17). Pour la suite des expérimentations, j'ai utilisé une concentration de  $10^6$  protoplastes par mL.



**Figure 17. Influence de la densité des cellules dans la transformation de protoplastes.**  
Boîte à moustache représentant la fréquence de transformation relative en fonction de la densité des protoplastes dans la solution de transformation. Les points roses montrent les données réelles.

**En résumé :** Les conditions définies pour l'électroporation des protoplastes de pomelo Star Ruby utilisées dans le cadre de mes expérimentations ont été fixées à :  $\tau = 90$  ms ; T = 170 V ; densité =  $10^6$  protoplastes / mL.

### 3. Régénération de plantes à partir de protoplastes.

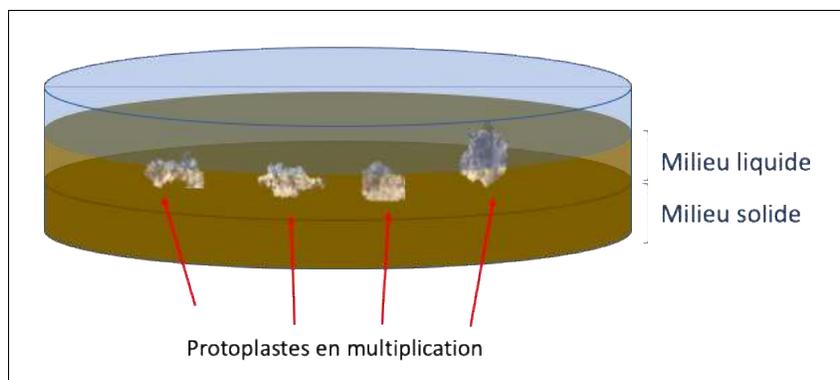


**Figure 18. Induction de l'embryogenèse à partir des protoplastes.**  
Protocoles de régénération suivis après transformation de protoplastes.

La troisième étape critique de ce projet a consisté à régénérer des plantes entières à partir de protoplastes isolés et transformés. Dans la mesure où cette étape de régénération est longue, les protoplastes issus de toutes les expérimentations précédentes ont été utilisés pour cette étape cruciale. Pour cela, les protoplastes ont été mis en culture pour des essais en suivant principalement deux protocoles différents décrits pour les agrumes (Figure 18). Le premier a été établi par D. Dambier (AGAP, Montpellier) et le second a été publié par Omar et ses collaborateurs en 2016.

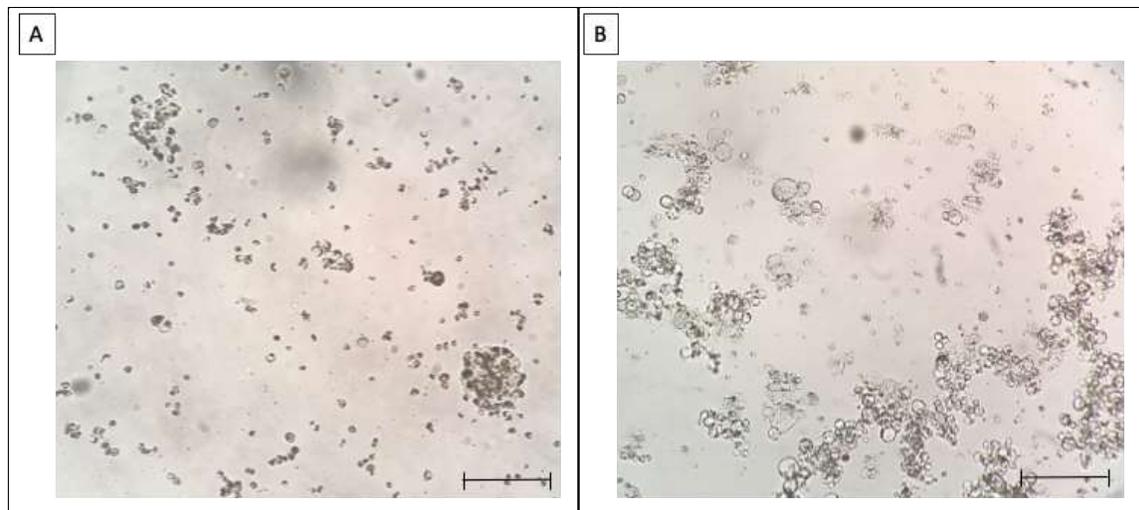
### **3.1. Protocole de régénération n°1 de Dominique Dambier.**

La première approche a consisté, après l'électroporation, à ajouter aux protoplastes électroporés 3,4 mL de milieu liquide BH3 (saccharose 0,7 M) puis de les étaler sur du milieu MT gélosé (saccharose 0,6 M) (Figure 19). Après 2 semaines de culture à l'obscurité, les protoplastes sont transférés à la lumière (intensité de  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , photopériode 16 h / 8 h (jour/nuit) à  $27 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ ). La pression osmotique a ensuite été diminuée progressivement en ajoutant régulièrement un mélange des milieux liquides BH3 0,6 M : MT 0,15 M (2:1, v/v) pendant plusieurs semaines pour induire la formation de proembryons. Finalement, les cellules sont transférées sur un milieu contenant du sorbitol ou du galactose pour induire la maturation des embryons.



**Figure 19. Culture de protoplastes en suspension et en milieu solide simultanément.**

La mise en œuvre de ce protocole s'est révélée être infructueuse avec les protoplastes de Pomelo Star Ruby. Le taux de mortalité constaté était très important dès les premières semaines de culture (Figure 20A). Une alternative a été de conserver les protoplastes dans du milieu liquide BH3. Dans ce cas, les protoplastes ont survécu jusqu'à 4 semaines (Figure 20B) mais sont morts dès que la diminution de la pression osmotique a été initiée.



**Figure 20. Protoplastes en culture après transformation par électroporation complétés avec le mélange BH3 0,6 M : MT 0,15 M (2:1, v/v).**

(A) Protoplastes après 15 jours de culture en milieu solide MT/liquide BH3 et (B) après 3 semaines en milieu de culture liquide BH3. Échelle = 250  $\mu\text{m}$ .

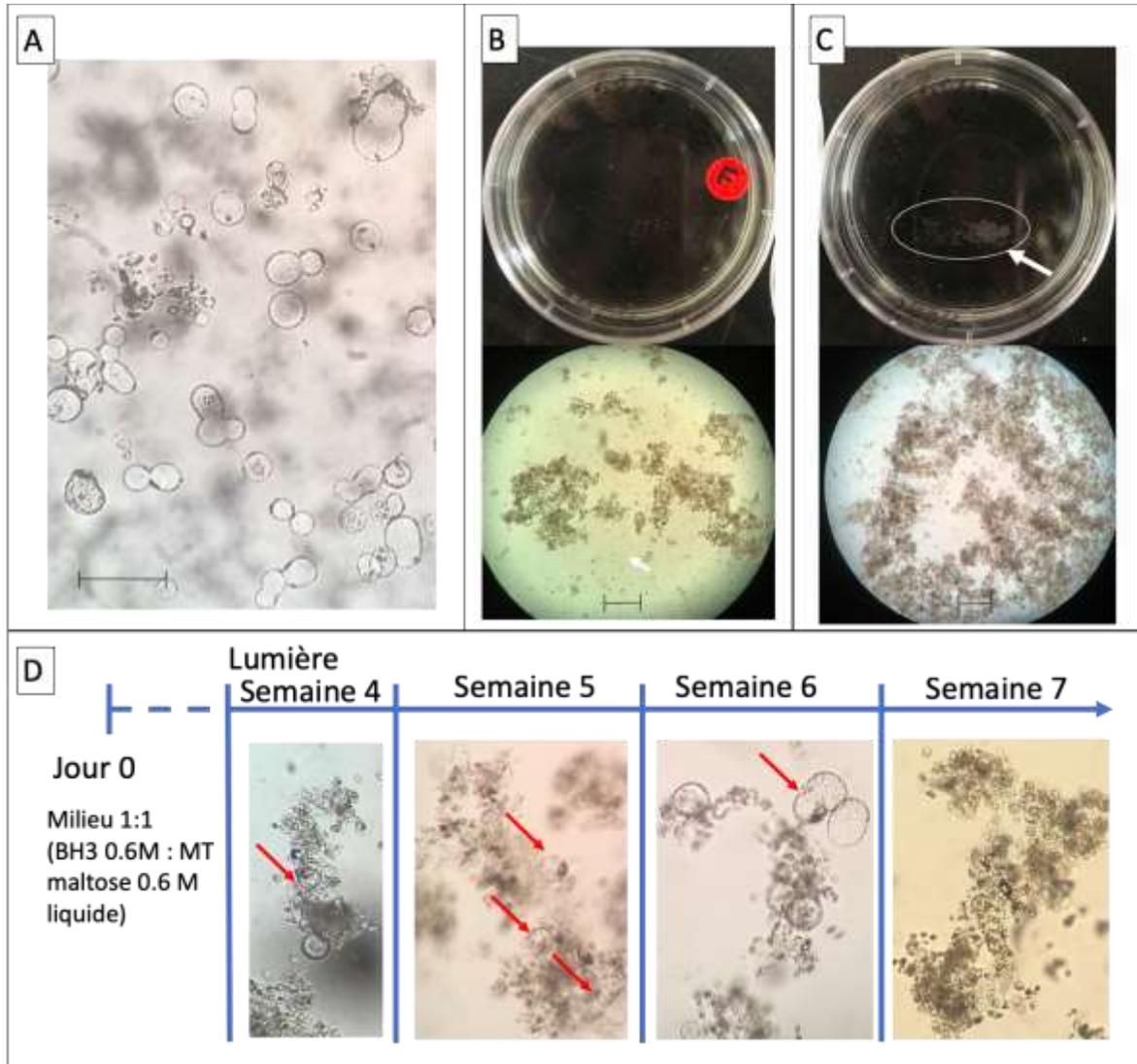
### 3.2. Protocole de régénération n° 2 de Omar et al. 2012

Pour ce second protocole,  $2 \times 10^6$  protoplastes sont mis en culture en suspension à l'obscurité dans 2 mL de milieu liquide BH3. Après quatre semaines, la pression osmotique a été réduite en ajoutant progressivement 0,5 mL d'un mélange des milieux BH3 (0,6 M), MT (saccharose 0,6 M) et MT (saccharose 0,15 M) (1:1:1, (v/v/v) et les cellules ont été transférées à la lumière (intensité de  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Après 6 semaines de culture, j'ai ajouté 2 mL d'un mélange BH3 (0,6 M) et MT (maltose 0,15 M) (1:2, v/v). Les cellules ont ensuite été déposées sur un milieu gélatinisé contenant du MT (maltose 0,15 M). Enfin, les cellules ont été placées à la lumière (intensité de  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), à 28 °C avec une photopériode 16 h / 8 h (jour / nuit) à 27 °C +/- 2 °C.

Cette méthode, m'a permis d'obtenir des divisions cellulaires (Figure 21A) jusqu'à l'obtention de structures macroscopiques (Figure 21B et C). Cependant, si à six semaines les cellules étaient encore vivantes, elles n'ont pas survécu au transfert sur milieu solide MT (maltose 0,15M) (Figure 21D).

### 3.3. Protocole de régénération n° 3 adapté de Omar et al. 2012

Le troisième protocole mis en œuvre consistait à réduire plus doucement l'osmoticum et à faire le transfert dans du milieu solide MT maltose après avoir laissé aux protoplastes le temps de s'adapter à la nouvelle pression osmotique. Les premières étapes de ce protocole sont identiques au précédent.



**Figure 21. Protoplastes en culture après transformation par électroporation.**

(A) Protoplastes transformés en division après 3 jours de culture. Protoplastes en culture après 4 semaines après électroporation (B) avec vecteur et (C) témoin négatif sans vecteur. Pour (B) et (C), les photos en haut montrent les protoplastes en boîte de Pétri de 6 cm et les photos en bas sous le microscope. La flèche blanche montre la formation des amas macroscopiques de protoplastes. Les lignes d'échelle indiquent 250  $\mu\text{m}$ . (D) Suivi de la réduction d'osmoticum. Les flèches rouges montrent des protoplastes actifs.

Après 4 semaines de culture à l'obscurité, 0,25 mL d'un mélange BH3 (0,6 M), MT (saccharose 0,6 M) et MT (saccharose 0,15 M) (1:1:1) sont ajoutés aux 2 ml de culture initiaux. Les cellules sont transférées à la lumière (intensité de 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Une semaine plus tard (i.e. semaine 5), 0,25 mL du même mélange est ajouté à la suspension. En semaine 6, 2 mL d'un mélange composé des milieux BH3 (0,6 M) et MT (maltose 0,15 M) (1:2) ont été ajoutés et les cultures ont été transférées dans un environnement lumineux plus intense (intensité de 70  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) avec une photopériode de 16 h / 8 h de

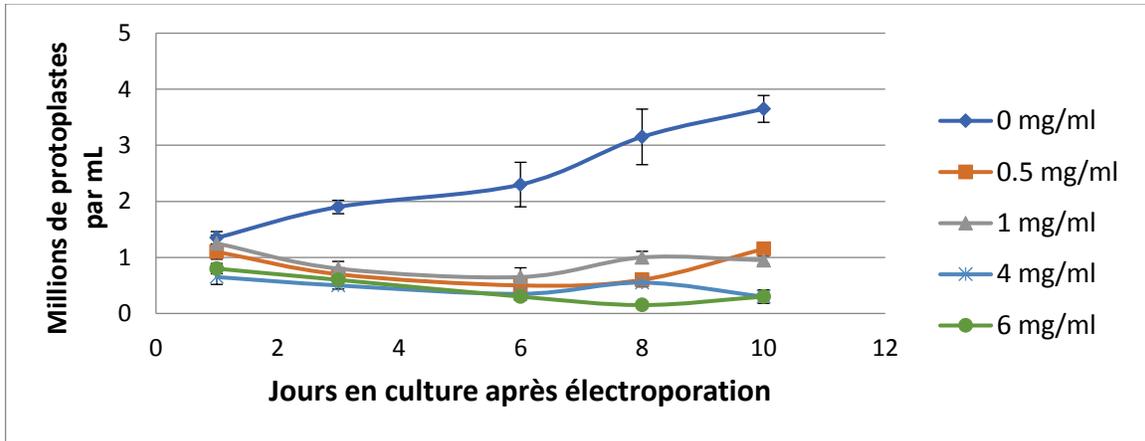
photopériode (jour/nuit) à 27 °C +/- 2 °C. Enfin, à la 7<sup>ème</sup> semaine, la suspension cellulaire a été déposée sur un milieu gélifié MT (maltose 0,15 M).

Les résultats obtenus avec cette approche ont permis de conserver les cellules en culture pendant 7 semaines. Malheureusement, le transfert sur milieu solide a, encore une fois, été léthal.

### **3.4. Sélection des protoplastes transformés en régénération.**

L'objectif de l'approche consiste à ne modifier qu'un gène impliqué dans la synthèse des furocoumarines en y introduisant une mutation ponctuelle. La sélection des plantes transformées ne peut donc pas se faire sur la base de l'intégration d'un gène de résistance comme cela est fait classiquement dans des approches de transgénèse. Pour éviter de cribler des milliers de plantules régénérantes, l'approche que nous avons souhaité mettre en place a consisté à transformer les protoplastes avec un plasmide non intégratif exprimant un gène de résistance à un antibiotique. Le plasmide ne s'intégrant pas dans le génome, il sera éliminé au fur et à mesure des divisions cellulaires. Les cellules transformées présenteront cependant une résistance transitoire plus importante à cet antibiotique. Pour mettre en œuvre cette stratégie j'ai utilisé le plasmide non intégratif pBNRF construit par Schaefer *et al.* (2010) et qui possède un gène conférant la résistance à la kanamycine. Ce vecteur a déjà été utilisé avec succès pour la sélection de cellules de *Physcomitrella patens* transformées.

Pour cette approche, nous avons d'abord testé la multiplication des protoplastes non transformés dans du milieu contenant l'antibiotique.  $10^6$  / mL de protoplastes ont été mis en culture dans du milieu BH3 avec différentes concentrations de kanamycine. Les résultats obtenus indiquent que les protoplastes arrêtent de se multiplier dès que l'antibiotique est présent dans le milieu de culture (Figure 22). Dans des expériences préliminaires nous avons déterminé qu'en dessous de 0,5 mg / mL il n'y avait pas d'effet significatif. Ensuite, des expériences de transformation avec le vecteur pBNRF ont été réalisées et les protoplastes ont été mis en culture dans les mêmes conditions que les protoplastes non transformés. Néanmoins il n'a pas été possible d'élucider une tendance claire d'évolution des protoplastes lorsqu'ils sont en sélection. Il semblerait que cette méthode de sélection n'est pas l'adéquate et il faudrait tester d'autres antibiotiques tel que la rifampicine, comme décrit par Schaefer *et al.*, 2010.



**Figure 22. Évolution des protoplastes en culture à différentes concentrations de kanamycine après une électroporation sans vecteur de transformation.**  
Valeurs moyennes des 4 réplicats en montrant l'erreur standard.

**Résumé :** cette dernière partie ne m'a pas permis de mettre en place un protocole de régénération de plantes à partir de protoplastes de Pomelo Star Ruby. Néanmoins de nombreuses pistes d'amélioration se sont montrées prometteuses. Les cellules ont pu se multiplier de manière efficace jusqu'à l'obtention de microcals en suspension. Le transfert sur un milieu solide s'est révélé le facteur limitant à ce jour.

#### 4. Discussion et perspectives

Avant de réaliser l'édition du génome de Star Ruby avec le système CRISPR/Cas9, il a été nécessaire de mettre en place les conditions d'isolement, de purification, de transformation et de régénération des protoplastes. Ce travail a été confronté à de nombreux freins méthodologiques liés à la vitesse de croissance des tissus végétaux, mais également à la fragilité de ce matériel végétal. Dans le cadre des travaux décrits dans ce premier chapitre, j'ai cependant obtenu un certain nombre de résultats positifs et encourageants pour la suite. Une avancée importante et capitale de ce travail a été réalisée en passant de la production de protoplastes à partir de cultures cellulaires. Grâce à cette approche j'ai pu obtenir des rendements de  $5 \times 10^6$  à  $10^7$  protoplastes / g de cellules ce qui est un bon rendement, selon Omar et ses collègues. Outre ces rendements cette approche nous a également permis de produire plus de cellules et plus rapidement en comparaison des cals) ce qui s'est avéré intéressant pour réaliser les mises au point pour les autres étapes du processus général d'édition de génome.

Si la transformation de protoplastes est très largement décrite dans la littérature scientifique pour de nombreuses plantes modèles, elle l'est très peu pour les agrumes. Différentes approches sont envisageables, dont l'électroporation. Des travaux de mise au

point considérables ont été nécessaires pour adapter les protocoles décrits (et notamment celui de Niedz et al) aux protoplastes de Pomelo Star Ruby. Nous avons ainsi établi des conditions permettant d'atteindre un taux de transformation raisonnable par rapport à la perte des protoplastes liée la décharge du choc électrique. Les conditions que j'ai mises au point dans ce travail peuvent néanmoins encore être améliorées si nécessaire. Par exemple un facteur qui peut affecter l'efficacité de transformation est le temps écoulé entre l'isolement des protoplastes et la transformation. Il a été montré que les cellules commencent à régénérer leur paroi pectocellulosique dès l'élimination de la solution enzymatique. (Mathur & Koncz, 1998; Ahmad A. Omar et al., 2016). Un autre facteur d'amélioration pourrait être de réaliser la transformation en présence de PEG qui reste une alternative souvent décrite dans la littérature. Cette approche présente cependant un inconvénient majeur car elle nécessite de réaliser plusieurs lavages post transformation qui causent la perte de beaucoup de protoplastes. Par ailleurs cette approche peut aussi s'avérer coûteuse si on prend en compte que les lavages doivent être réalisés avec du milieu de culture riche BH3 (Fleming et al., 2000).

La régénération de plantes à partir de protoplastes est reconnue comme étant problématique pour de nombreuses plantes. Ainsi, Lin et al. (2018) mentionnent que, malgré une optimisation des méthodes de transformation de protoplastes pour différentes plantes mono et dicotylédones, l'obtention de protoplastes de bonne qualité et leur régénération, restent les deux plus grandes contraintes. Les agrumes pouvaient représenter une exception dans la mesure où ils sont considérés comme système modèle pour l'embryogenèse somatique à partir de protoplastes (Grosser et Gmitter 1990; Omar et al. 2016). Malheureusement les observations faites pour d'autres espèces d'agrumes ne semblent pas facilement transposables aux cals de pomelo Star Ruby. Pour contourner ce problème il faut à présent envisager des méthodes nouvelles. Par exemple, une méthode intéressante pourrait consister à utiliser des pellicules d'alginate pour fixer les protoplastes et les immerger dans du milieu liquide de régénération. Cette technique présente plusieurs avantages, comme la traçabilité des cellules et la facilité de changer les milieux liquides frais selon les besoins. Il permet aussi de réduire la libération des substances toxiques dans le milieu et l'accélération des étapes et du temps de réponse des cellules vers la réponse de régénération (Pati, Sharma, & Ahuja, 2005).



## Partie 2 : Stratégie générale CRISPR/Cas9 pour inhiber la voie de biosynthèse des furocoumarines chez le Pomelo Star Ruby

**Éléments de contexte préliminaire** - Des travaux réalisés par Karamat et ses collaborateurs en 2014 ont démontré le rôle de deux prényltransférases : l'une dans la synthèse de DMS et l'autre dans la synthèse d'osthenol chez le panais (Figure 23). Ces étapes correspondent à la porte d'entrée vers les furocoumarines linéaires et angulaires (Karamat et al., 2014).

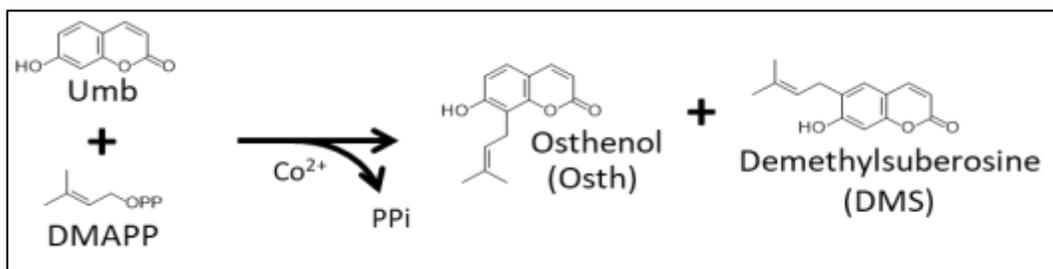


Figure 23. Réaction catalysée par la prényltransférase de panais.

Une collaboration tripartite entre le LAE, le laboratoire du Pr. Masa Mizutani (Université de Kobe) et du Pr. Kazufumi Yazaki (Université de Kyoto), a permis d'identifier la séquence nucléotidique d'un gène orthologue chez les agrumes. La caractérisation fonctionnelle de la protéine correspondante (CpPT4) a été réalisée par Ryosuke Munakata à partir de *C. paradisi* var. Marsh. Ainsi quand cette protéine est surexprimée dans le tabac et qu'elle est extraite dans des microsomes, elle est en mesure de catalyser la synthèse de DMS mais également d'osthérol (à l'état de trace uniquement) (Figure 23).

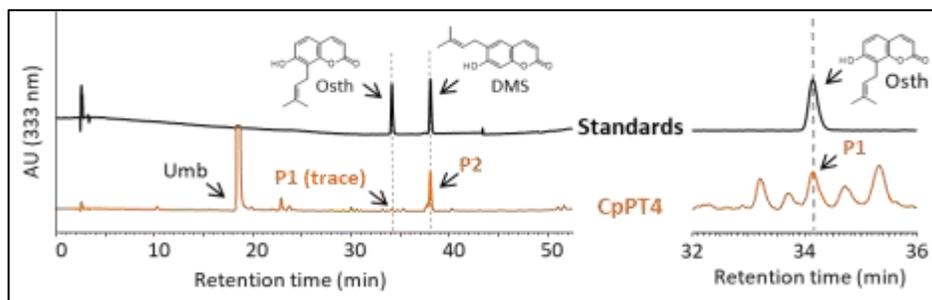


Figure 24. Caractérisation fonctionnelle de CpPT4. Des microsomes de feuilles de tabac surexprimant CpPT4 sont capable de catalyser la transformation d'Umbelliféron majoritairement en DMS.

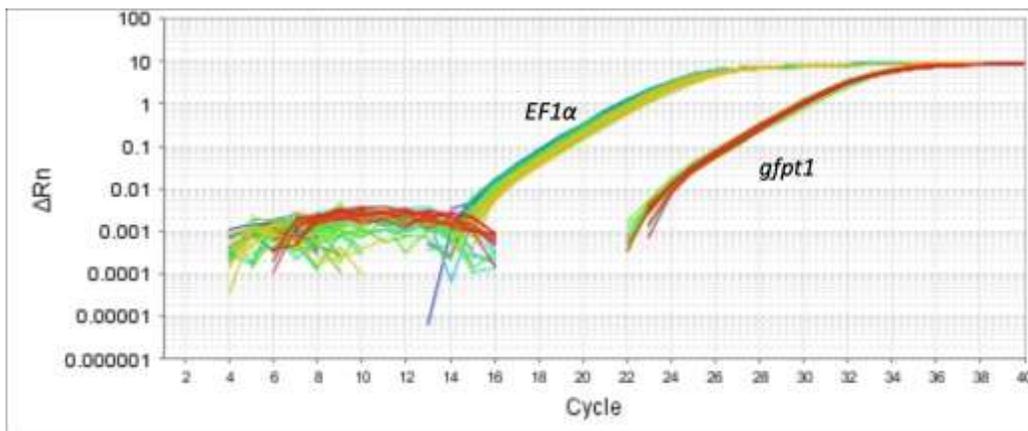
La découverte de cette enzyme chez les agrumes nous amené à émettre l'hypothèse que son inhibition par une approche d'édition de génome pourrait empêcher la production de furocoumarines chez le Pomelo Star Ruby. Ainsi, la deuxième partie de ce manuscrit est

dédiée à la caractérisation moléculaire de l'orthologue de *CpPT4* chez le pomelo et à la mise en œuvre d'une stratégie de CRISPR/Cas9 pour inhiber sa fonction.

## 1. Caractérisation moléculaire de GFPT1 (orthologue de CpPT4) chez le pomelo Star Ruby

### 1.1. Expression de *GfPT1*

Bien que présentant une filiation génétique, les agrumes se distinguent par de nombreuses différences qu'elles soient au niveau génomique ou phytochimique. Le gène codant pour *CpPT4* a été identifié chez *C. paradisi*. Il fallait dans un premier temps s'assurer que ce gène était également présent chez le Pomelo Star Ruby et de plus s'assurer que son ARNm était exprimé.



**Figure 25. Quantification par qPCR de l'expression du *gfpt1* (orthologue de *CpPT4*).**

Quantification réalisée sur l'ADNc synthétisé à partir de l'ARN extrait de la peau de *Citrus paradisi* var. Star Ruby. Gène rapporteur : facteur d'élongation 1 $\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ).

Pour cela, j'ai réalisé une extraction d'ARNm totaux à partir de cellules de la peau du fruit (i.e. flavedo) qui est le tissu dans lequel de fortes concentrations en furocoumarines avaient déjà été mises en évidence (Dugrand et al, 2013). Afin de vérifier que les ARNs extraits étaient de qualité suffisante j'ai réalisé une qPCR sur le gène de ménage *EF1 $\alpha$*  (Figure 25). Les qPCR réalisées en ciblant la séquence correspondant à *CpPT4* ont permis de mesurer un signal de fluorescence (SYBRGREEN) montrant ainsi que 1) ce gène est proche du gène codant pour une PT chez le Pomelo Star Ruby puisqu'il peut être amplifié avec des amorces définies d'après la séquence nucléotidique de *CpPT4*, 2) que ce gène est exprimé dans les tissus produisant des furocoumarines et, 3) que ce gène bien que largement sous exprimé par rapport au gène de référence, est relativement bien exprimé dans le flavedo des fruits. Dans la suite du manuscrit je ferai référence au gène orthologue de *CpPT4* en le nommant *GfPT1* (Gf pour Grapefruit).

## 1.2. Clonage de la séquence codante de *GfPT1*

La séquence nucléotidique correspondant à *GfPT1* n'étant pas disponible dans les bases de données il a fallu dans un premier temps la cloner et la séquencer. Dans la mesure où les résultats préliminaires basés sur la qPCR se sont révélés être positifs, j'ai considéré que le gène devait être très proche à celui de *C. paradisi*. J'ai ainsi utilisé cette séquence pour définir les amorces directe et reverse de l'Annexe 3 pour amplifier la séquence codante à partir d'ARN totaux extraits de flavedo du pomelo.

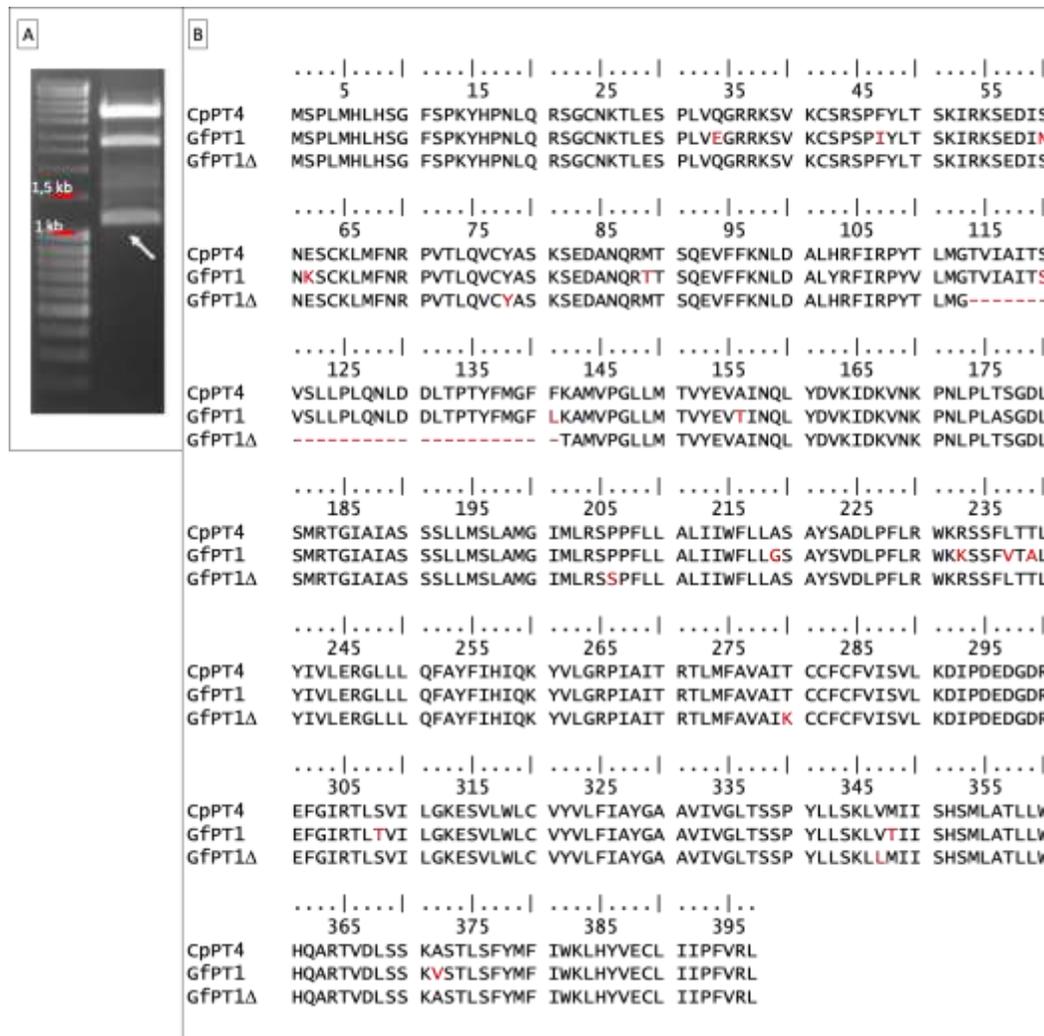


Figure 26. Alignement de séquences codantes.

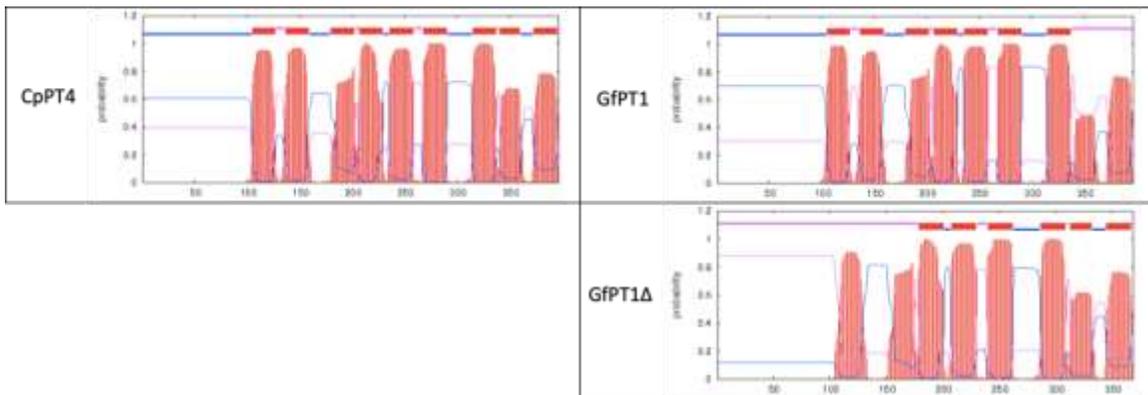
Migration par électrophorèse après amplification par PCR (A), la séquence codante pour la GfPT1 est signalée par une flèche à 1200 pb. Alignement des séquences peptidiques de la GfPT1 clonée (B).

L'amplification avec les amorces décrites à partir d'ADNc réalisée avec l'enzyme PrimeStar Max (Takara) dans les conditions décrites dans le matériel et méthode a généré plusieurs bandes (Figure 26A) démontrant ainsi une spécificité moyenne corrélée à l'existence de séquences présentant probablement des homologies significatives. Parmi les

amplicons, l'un d'entre eux correspondait à la taille attendue de 1200 pb. Le clonage et le séquençage de cette bande a mis en évidence un mélange de deux séquences différentes. La première présentait 99% d'identité avec la séquence *CpPT4* identifiée par Munakata. Cette séquence codante a été nommée *gfpt1*. La seconde, bien qu'ayant une très forte identité avec *CpPT4* dispose d'une délétion de 84 pb (Figure 26B). Cette délétion n'engendre pas de changement de cadre de lecture et la protéine correspondante peut potentiellement avoir une activité. Dans la suite de ce document, je l'ai nommée *gfpt1Δ*.

### 1.3. Analyse bio-informatique des séquences peptidiques

Une analyse des séquences peptidiques correspondantes avec l'outil ChloroP 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) prédit que les deux séquences possèdent un peptide signal permettant l'ancrage transmembranaire du côté N-terminal spécifique dans les plastides. Ce résultat est cohérent avec la caractérisation moléculaire de la localisation subcellulaire chloroplastique des autres prényltransférases identifiées jusque-là chez les apiacées (*PsPT*, *PcPT*) et les agrumes (*CIPT1*) (Karamat et al., 2014; Munakata et al., 2014, 2012, 2016).



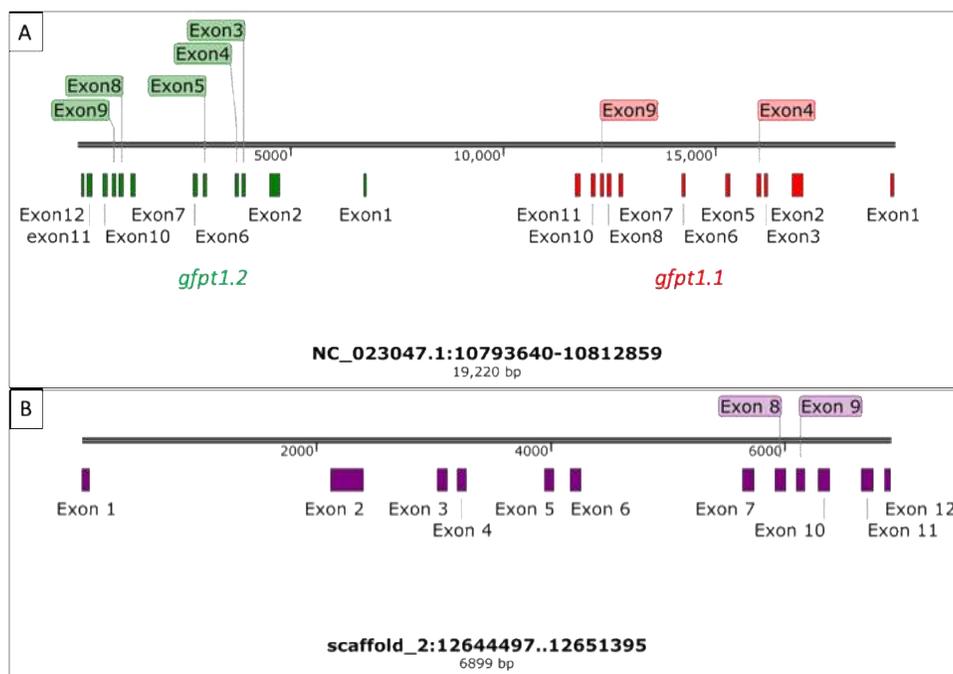
**Figure 27. Analyse prédictive de régions transmembranaires des GfPT1 clonées et de CpPT4.** Les régions qui présentent plus de 0,15 probabilité d'être transmembranaires sont marquées par un rectangle rouge en haut, les régions internes par la ligne bleue et les régions externes par la ligne rose. Figures obtenues avec TMHMM v2.0.

Pour vérifier si la délétion observée dans *GfPT1Δ* avait un impact sur la structure générale de la protéine, j'ai analysé les séquences peptidiques avec l'outil TMHMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). *GfPT1* et *CpPT4* disposent toutes les deux de 9 hélices  $\alpha$  transmembranaires, à l'instar des autres prényltransférases décrites dans la littérature. En revanche, la délétion chez *GfPT1Δ* modifie les deux premières régions transmembranaires (Figure 27). Pour la suite de ce travail, je me suis focalisée sur *GfPT1* qui avait la plus forte probabilité de catalyser la transformation d'umbelliférone en DMS.

### 1.3.1. Analyse de la structure génomique de la séquence codant pour GFPT1

L'élaboration d'une stratégie CRISPR/Cas9 requiert idéalement une connaissance du génome de la plante cible. Les données génomiques des agrumes restent à ce jour très parcellaires. Afin d'identifier au mieux la cible et les positionnements des sgRNA cibles j'ai réalisé une analyse des bases de données génomiques disponibles de différentes variétés de *Citrus*.

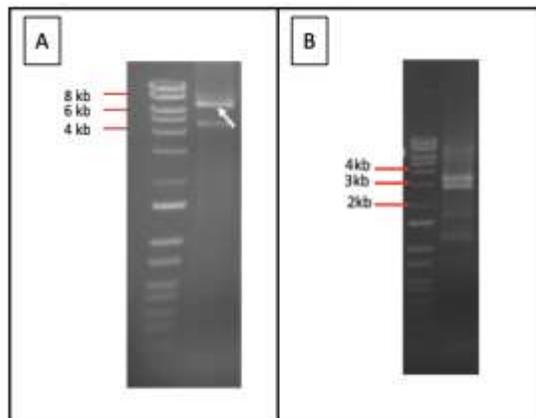
**GenBank** - Une analyse par BLAST, en utilisant la séquence codante de *gfpt1* de Genbank a permis d'identifier la séquence assemblée NC\_023047 du génome de *C. sinensis* (orange douce) rendu publique par Q. Xu *et al.* 2013. Cette séquence, de 19 220 nucléotides, contient deux séquences correspondant à *gfpt1* de pomelo. Ces deux copies, probablement issues d'un événement de duplication, ne sont séparées que de 6000 nucléotides (Figure 28A). La première séquence codante (*gfpt1.1* en rouge) contient 11 exons et la seconde (*gfpt1.2* en vert) dispose de 12 exons. Les séquences codantes des *gfpt1.1* et *gfpt1.2* allant du codon initiateur au codon stop s'étendent sur 7768 et 7018 nucléotides, respectivement et elles ont une identité de 92 %. En alignant uniquement les exons putatifs elles ont 89% d'identité nucléotidique. Le cinquième exon de *gfpt1.2* est absent chez *gfpt1.1*. Toutes les deux ont une identité nucléotidique de 92 % et 93 %, respectivement avec la séquence *gfpt1* que j'ai clonée à partir de pomelo Star Ruby. Cette différence peut être liée à la différence de variété d'agrumes.



**Figure 28. Carte génomique de *gfpt1*.**  
A partir du génome annoté de *Citrus sinensis* (A) et de *Citrus clementina* (B).

**Phytozome** – D'autres bases de données publiques permettent d'accéder à des données génomiques complémentaires. Ces génomes ne sont cependant pas encore consolidés et ne donnent accès qu'à des assemblages de contigs. Ainsi, l'analyse réalisée sur *C. sinensis* ne permet pas de mettre en évidence la présence de *gfpt1*. Le génome de *C. clementina* est cependant plus complet et permet de mettre en évidence une structure de gène proche de celle de *gfpt1.2* de *C. sinensis* (Figure 28B).

Pour vérifier si la séquence génomique de *gfpt1* était dupliquée comme c'est le cas pour *C. sinensis*, j'ai réalisé une amplification par PCR à partir de ADN génomique extrait de Pomelo Star Ruby. La PCR a été réalisée avec l'enzyme PrimeStar GXL (Takara) permettant l'amplification de fragment de DNA de grande taille. L'analyse des produits de PCR par électrophorèse en gel d'agarose révèle une bande de 7 kb environ et une bande de 5 kb environ (Figure 29A). En me basant sur les séquences génomiques de *C. sinensis* et *C. clementina* la séquence génomique de *gfpt1* devrait être de 6700 à 7700 pb.



**Figure 29. Amplification de la séquence génomique du *gfpt1*.**

Amplification avec les amorces directe et reverse utilisés pour cloner la séquence codante de *GfPT1* (A).  
Amplification avec deux amorces internes 3F et 5R (B).

Le service de séquençage (Macrogen Europe) que nous utilisons au laboratoire ne permet pas de séquencer au-delà de 600 nucléotides. J'ai donc mis en œuvre une stratégie pour séquencer uniquement la séquence génomique de l'exon 6 en faisant une amplification interne du gène (amorce 5R, 3F dans Annexe 3), qui m'a donné deux bandes de 3 kb (Figure 29B). Ensuite, je l'ai fait séquencer avec une troisième amorce (Am1 en annexes) qui s'hybride à 100 pb du début de l'exon 6. Cet exon de 91 pb est présent dans les deux séquences d'orange ainsi que dans celle de clémentine retrouvée sur les banques de données. Ces 91 pb sont aussi présentes dans la séquence codante de *CpPT4* et *GfPT1* de pomelo Star Ruby (décrites plus tôt dans la section 1.2 de cette partie du manuscrit). Les résultats des séquençages montrent qu'il y a deux séquences génomiques de l'exon 6 dans

le pomelo (Figure 30). Ces deux séquences présentent encore quelques différences par rapport à la GfPT1 précédemment clonée.



**Figure 30. Alignement de l'exon 6 des différentes séquences.**

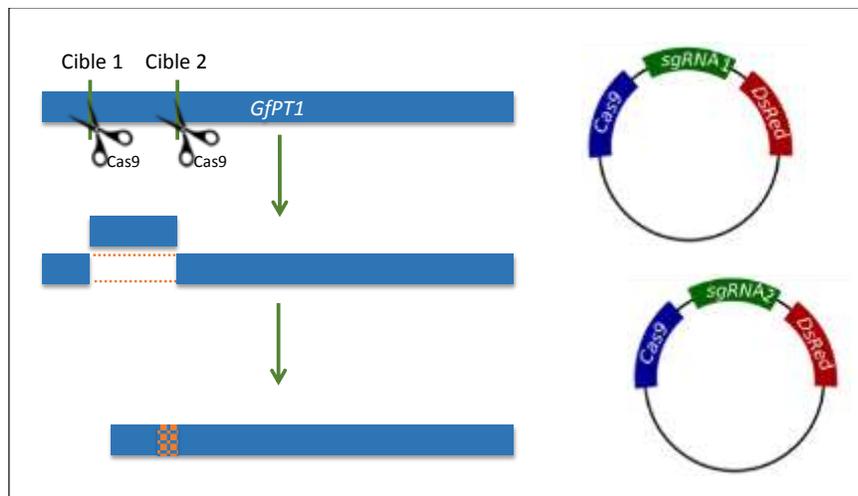
Les trois premières sont des séquences trouvées dans les banques génomiques d'orange et de clémentine. Ensuite les séquences codantes de PcPT4 et GfPT1 de pomelo Marsh et Star Ruby (respectivement). Finalement les deux séquences d'ADN génomique de pomelo Star Ruby.

Cette première partie m'a permis d'identifier et de caractériser *in silico* la séquence codante pour la *GfPT1*. Sur la base de données obtenue avec *CpPT4*, cette prényltransférase spécifique de pomelo Star Ruby métabolise potentiellement l'umbelliférone en DMS et correspond de fait à ma cible pour les travaux d'édition de génome. Mes expériences de qPCR ont permis de montrer que ce gène est bien exprimé dans la peau de pomelo, tissu producteur de furocoumarines. Par rapport à la structure génomique, il est possible que le *GfPT1* soit dupliqué ou que des séquences très similaires se trouvent dans le génome de pomelo et qu'il existe plus d'une forme allélique.

## 2. Mise en place de la stratégie CRISPR/Cas9 en vue d'inhiber la production de furocoumarines

### 2.1. Éléments de cadrage

Pour rappel, l'édition de génome par une approche CRISPR/Cas9 permet de réaliser une coupure spécifique et ciblée au sein de l'ADN génomique d'un organisme. Les mécanismes de réparation endogènes permettent de réparer cette coupure mais engendrent l'insertion ou la délétion d'un ou de plusieurs nucléotides (NHEJ). Cette modification ponctuelle peut générer des changements de cadre de lecture et de fait rendre un gène non fonctionnel.



**Figure 31. Stratégie de knockout du gène *gfpt1* par une approche CRISPR/Cas9.**  
Les vecteurs utilisés (pDe-Cas9-DsRed-cible) expriment la Cas9, les sgRNA cibles et la protéine DsRed.

Une stratégie alternative consiste à réaliser simultanément au moins deux coupures en utilisant 2 sgRNA spécifiques de la séquence génomique cible et situés à des sites distants. Le fragment se trouvant entre les 2 sites peut ainsi être éliminé générant, cette fois, une délétion beaucoup plus importante. C'est cette seconde stratégie que j'ai souhaité mettre en place dans le cadre de ce travail car il me semblait plus efficace qu'une mutation simple pour inhiber une voie de biosynthèse (Figure 31).

## 2.2. Identification des séquences cibles

Les séquences cibles ont été identifiées en utilisant les outils bioinformatiques CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) et CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) sur la séquence codante de *gfpt1*. Le génome de *C. paradisi* n'étant pas complètement séquencé et consolidé, il n'était pas possible de détecter des hybridations non spécifiques des sgRNA. Il est de fait possible que les séquences identifiées ne soient pas spécifiques à ce seul gène ce qui entraîne un risque non négligeable de coupures en dehors de la cible (i.e. « *off-target* »). L'analyse réalisée à l'aide de ces 2 outils a permis de générer 113 séquences différentes à partir de la séquence codante de *gfpt1* pour éviter que la mutation tombe sur un intron. A partir de ces séquences, j'ai réalisé un tri sélectif et éliminé les séquences :

- contenant une séquence TTTT
- présentant des différences significatives avec CpPT4
- potentiellement à cheval sur deux exons (sur la base des données génomique de *C. sinensis*)
- localisées dans les 300 derniers nucléotides, séquence qui est très homologe avec d'autres prényltransférases.

J'ai donc restreint à 10 le nombre de cibles pertinentes. J'ai ensuite sélectionné une cible candidate sur l'exon 6 et une autre sur l'exon 7. La liste a ainsi été réduite à 2 séquences (Tableau 2).

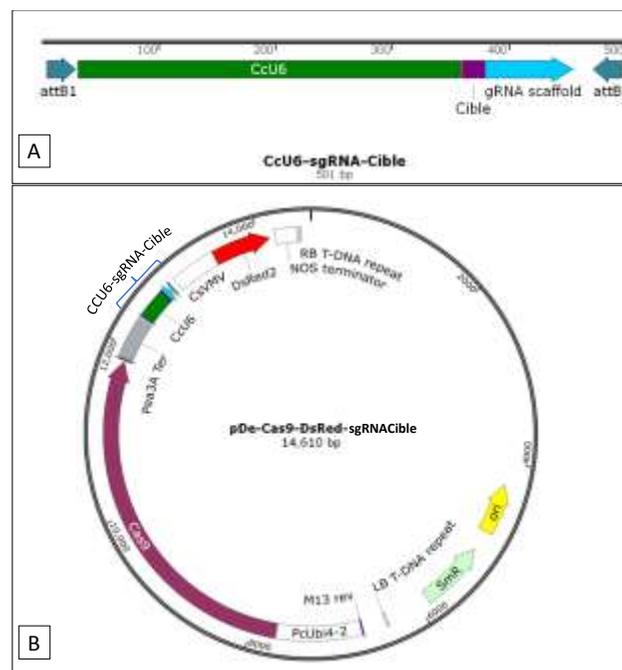
| Position | Début | Fin | Brin | Séquence                        |
|----------|-------|-----|------|---------------------------------|
| Exon 6   | 632   | 654 | -    | <u>CCCT</u> CATCATATGGTTTCTCCT  |
| Exon 7   | 716   | 738 | +    | CATTGTACATCGTGCTAGAG <u>AGG</u> |

**Tableau 2. Séquences candidates cibles.**

Les nucléotides soulignés marquent la séquence PAM (NGG ou CCN).

### 2.3. Construction des vecteurs CRISPR

Les 2 séquences cibles ont été synthétisées par Eurofins Genomics (<https://www.eurofinsgenomics.eu/>). Ces séquences ont été placées sous le contrôle du promoteur U6 pour l'expression d'ARN guides de *C. clementina* et en amont d'une séquence gRNA scaffold. La séquence complète a été flanquée de deux séquences de recombinaison Gateway (*attB*), (Figure 32A). Les constructions de sgRNA cibles ont été transférées par BP recombinaison dans le vecteur de clonage pDONOR®207 et ensuite par LR recombinaison dans le vecteur pDe-Cas9-DsRed (Figure 32B).



**Figure 32. Construction du plasmide pour la transformation CRISPR/Cas9.**

La cassette CcU6-sgRNA-Cible (A) contient la séquence cible et en amont le RNA guide (gRNA) sous le contrôle du promoteur U6 de *C. clementina* (CcU6) et les sites de recombinaison *attB1* et *attB2*. Le vecteur pDe-Cas9-DsRed-sgRNA-Cible (B) contient la séquence codante de la protéine fluorescente DsRed2 placée sous le contrôle du promoteur constitutif CsVMV et la séquence nucléotidique codant pour la protéine Cas9 de *S. pyogenes* optimisée pour *A. thaliana* sous le contrôle du promoteur ubiquitine de persil PcUbi4-2.

### 3. Transformation génétique de protoplastes de Pomelo Star Ruby : caractérisation moléculaire

Pour la transformation des protoplastes, j'ai réalisé un mélange comprenant les plasmides pDe-Cas9-DsRed-CibleExon6 et pDe-Cas9-DsRed-CibleExon7 permettant l'expression des 2 séquences cibles (cf. Figure 32B) ainsi que le plasmide permettant la synthèse de l'endonucléase Cas9. Ces différents plasmides ont été introduits dans les protoplastes par électroporation selon la méthodologie décrite dans le chapitre précédent. Dans la mesure où le temps de régénération des plantules à partir des protoplastes est très long, j'ai réalisé des expérimentations préliminaires visant à démontrer qu'un événement de coupure de l'ADN génomique avait bien eu lieu sur un mélange de protoplastes transformés. L'avantage d'une telle approche est que je pouvais poursuivre la mise au point de la régénération et prouver que la stratégie était fonctionnelle. L'inconvénient est qu'en travaillant sur un mélange de protoplastes, j'ai fait des analyses sur du matériel génétique hétérogène comportant de l'ADN génomique sauvage et de l'ADN génomique potentiellement muté pouvant donc présenter des mutations ponctuelles à des délétions plus ou moins importantes (Figure 33).

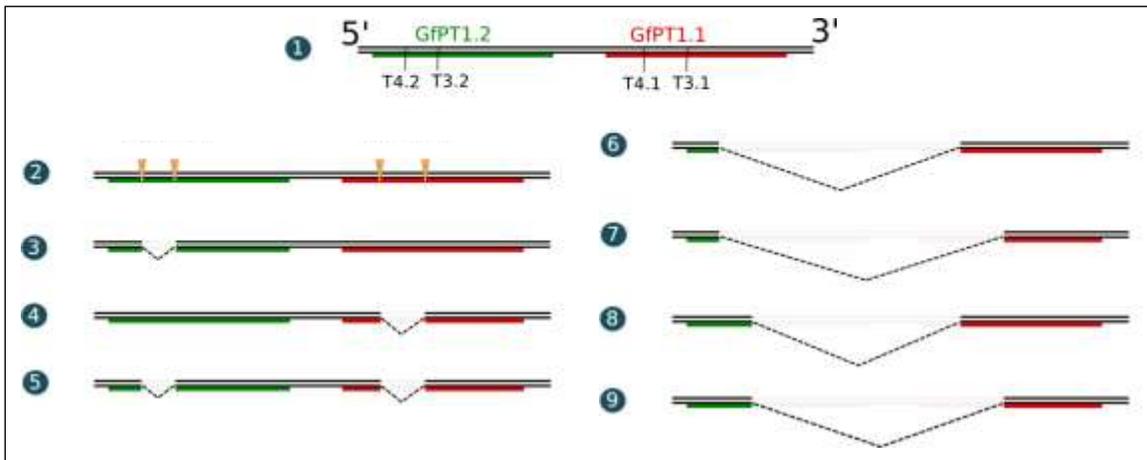
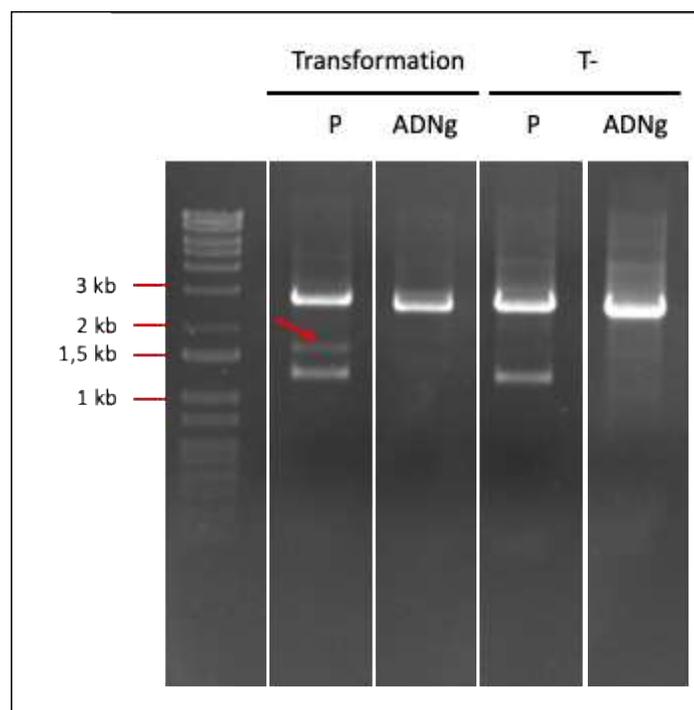


Figure 33. Mutations possibles induites par notre système CRISPR/Cas9.

Pour réaliser cette analyse j'ai mis en œuvre une méthodologie basée sur des PCR en appliquant 2 méthodes différentes avec les amorces 5R et 3F employées précédemment pour séquencer l'exon 6 (voir fin de la section 1.3.1 de cette partie du manuscrit). La première a consisté à faire les amplifications directement sur les protoplastes en utilisant l'enzyme KAPA3G Plant polymérase (Sigma-Aldrich). Cette approche présente l'avantage de travailler avec une suspension de quelques protoplastes dilués directement dans un tampon approprié et de réaliser la PCR sans extraction de l'ADN génomique. La seconde a consisté à extraire l'ADN génomique des cellules non transformées et à réaliser des PCR

classiques. L'avantage de cette méthode est d'avoir des résultats plus reproductibles dans la mesure où l'amplification est faite sur de l'ADN purifié et propre (mais qui nécessite plus de matériel végétal).

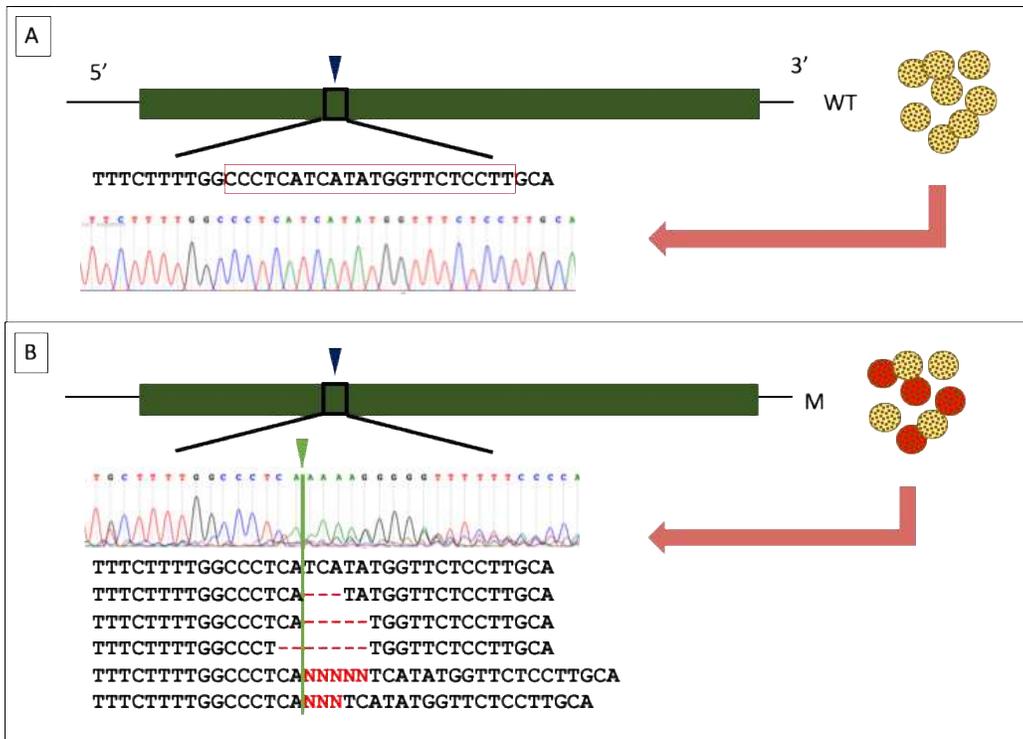
Pour cela, un même lot de protoplastes (7 jours post transformation) a été fractionné en 2. Une moitié a été centrifugée puis le culot a été suspendu dans 100  $\mu$ L d'eau ultra pure, et mélangés avec du tampon d'extraction contenant du  $\beta$ -mercaptoéthanol, comme indiqué par le protocole fourni avec le kit KAPA3G Plant polymérase. La seconde moitié a été utilisée pour réaliser une extraction d'ADNg en utilisant le kit DNeasy. Une amplification par PCR a été réalisée avec les primers 3F et 5R. Les résultats obtenus dans la PCR directe sur les protoplastes montrent clairement la présence d'une bande d'environ 1500 nt pouvant correspondre à des délétions induites (Figure 34, piste 1). En revanche, cette bande n'est pas mise en évidence dans les amplifications réalisées sur l'ADNg extrait des protoplastes (Figure 34, piste 2).



**Figure 34. PCR sur protoplastes transformés avec les constructions plasmidiques cibles.** Transformation avec pDe-Cas9-DsRed-CibleExon6 et CibleExon7 (Transformation) et sans vecteur (T-). P = amplification directe sur les protoplastes, ADNg = amplification sur l'extraction de l'ADN génomique des protoplastes. La flèche rouge montre une possible délétion par après la coupure CAS9.

Il n'a pas été possible d'identifier la séquence correspondant au fragment de 1500 pb par extraction de la bande et séquençage. Néanmoins en me référant aux prédictions de délétions de la Figure 33, il est possible que l'on soit dans la situation 3 et 5.

Certaines bandes correspondant à l'amplicon de 3000 nt ont été récupérées et séquencées. L'analyse de ces séquences a mis en évidence, dans certains cas, une mutation localisée à partir du quatrième nucléotide après la PAM (Figure 35A), ce qui correspond précisément au site de coupure attendu. L'analyse de la séquence montre également qu'après la séquence CCCTCA le chromatogramme devient illisible (Figure 35B) ce qui correspond à un mélange de plusieurs fragments d'ADN. Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où le morceau d'ADN séquencé provient d'une PCR réalisée sur un mélange de protoplastes dont certains n'étaient vraisemblablement pas génétiquement modifiés. Ce mélange de séquence ne permet malheureusement pas d'identifier le type de modification qui a eu lieu.



**Figure 35. Mise en évidence d'une possible mutation induite par CRISPR/Cas9.**

(A) Chromatogramme du séquençage des protoplastes non transformés (témoin négatif) (A) et des protoplastes transformés contenant encore des protoplastes non transformés (B). Le chromatogramme (B) montre une qualité diminuée après le troisième nucléotide depuis la séquence CCC (séquence PAM) où la possible coupure par la Cas9 est attendue. WT = protoplastes sauvages, M protoplastes transformés par électroporation avec les constructions pDe-Cas9-DsRed-CibleExon6.

Les résultats obtenus dans cette dernière partie semblent indiquer que la stratégie d'édition de génome fonctionne sur la cible que je me suis fixée avec, *a minima*, des modifications ponctuelles. Ces résultats devront être confortés notamment en clonant et en séquençant les amplicons.

#### 4. Discussion et perspectives

Les travaux réalisés par Karamat et ses collaborateurs ont permis d'identifier des enzymes responsables de la prénylation de l'umbelliférone chez les apiacées. Cette étape clef de la voie de biosynthèse des furocoumarines nous a semblé être une cible idéale pour mettre en place une stratégie visant à générer des pomelo Star Ruby ne produisant plus ces molécules et ce, de manière ciblée. En utilisant une approche de Data Mining nous avons ainsi pu identifier et caractériser une enzyme orthologue chez les agrumes et plus particulièrement chez la variété qui nous intéresse. L'analyse de la séquence prédit de nombreuses similarités structurales avec les protéines de panais montrant ainsi une conservation fonctionnelle au travers de différentes espèces de plante.

Les approches d'édition de génome représentent un réel progrès pour l'obtention de nouvelles variétés d'agrumes. Cette approche a déjà été validée pour de nombreuses plantes. Dans le cas des agrumes, seul Jia et ses collaborateurs ont généré des agrumes résistants à la maladie du chancre bactérien des Citrus (Jia *et al.* 2017) montrant ainsi la faisabilité de la méthode. Ces plantes décrites très récemment ont été obtenues après agro-infiltration. Il en résulte que les plantes régénérées obtenues sont potentiellement chimériques et correspondent à des amalgames de cellules qui sont potentiellement modifiées ou non. Dans le cas de la stratégie de construction de plantes ne produisant plus de furocoumarines, une telle approche ne pourrait pas être envisageable car les cellules non transformées continueraient à produire ces molécules. L'approche par transformation de protoplastes permet de s'affranchir de ce chimérisme puisque, dans ce cas, on part de cellules isolées transformées individuellement.

Les résultats préliminaires obtenus indiquent que j'ai réussi à générer des mutations ciblées avec mes constructions pDe-Cas9-sgRNA-Cible sur l'exon 6 de *gfpt1*. Il ne m'a malheureusement pas été possible de vérifier exactement en quoi consistaient ces mutations. Néanmoins je m'attends à des insertions de 1 bp ou à des courtes délétions (Feng *et al.*, 2014, 2013; Jia, Zhang, *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). Pour la suite, il sera cependant nécessaire de cloner les produits de PCR afin d'identifier très clairement quel type de modifications ont eu lieu.

La manque de connaissance sur la structure génomique du *gfpt1*, et de manière plus générale l'absence d'un génome de référence, a été un réel handicap. Il a été prouvé par Jia et ses collaborateurs que le pomelo, étant un hybride entre l'orange douce et le pamplemousse, possédait deux copies différentes du gène CsPDS et du promoteur CsLOBP. Dans le cadre de mon travail, j'ai pu constater qu'il y avait plusieurs séquences de *gfpt1* très proches de *CpPT4* chez le pomelo Star Ruby. Il semblerait aussi que chez l'orange ce gène

soit dupliqué. Si les gènes provenant des parents du pomelo sont différents, il est possible que l'approche soit infructueuse. En effet, l'inactivation d'un gène peut se révéler être non suffisante pour inhiber la synthèse des furocoumarines si le second (ou les autres) reste fonctionnel. Il est de fait nécessaire pour compléter ce travail d'identifier d'autres gènes impliqués dans la synthèse de ces molécules.

Pour finir, la technologie CRISPR/Cas9, est très récente et évolue très rapidement. Par la suite, il serait aussi intéressant d'utiliser également le promoteur YAO et la saCas9 (Jia, Xu, et al., 2017; Zhang et al., 2017), qui ont montré une amélioration importante, comme expliqué dans l'introduction, dans la transformation d'agrumes.

## **Partie 3 : Recherche des gènes codant pour des cytochromes P450 impliqués dans la voie de biosynthèse des furocoumarines.**

Les voies de biosynthèse du métabolisme spécialisé sont souvent complexes et il est fort probable que le simple fait de supprimer une étape catalytique ne soit pas suffisant pour empêcher la production des furocoumarines chez les agrumes. Il a par exemple été décrit par Dall—Acqua *et al.* (1979) que la synthèse du bergaptène pouvait se faire à partir de psoralène mais également à partir de 5-hydroxy-marmésine chez *R. graveolens* et *Ficus carica*. Pour limiter les risques liés à cette plasticité et pour pallier ces problèmes potentiels, nous avons envisagé la mise en place d'une approche de régulation combinatoire consistant en un empilement de mutations ciblées sur différentes séquences nucléotidiques codant pour des protéines à activité catalytique distincte et impliquées dans la voie de biosynthèse. Cette stratégie devrait permettre l'arrêt total et ciblé de la production de ces molécules chez notre modèle d'étude : le pomelo variété Star Ruby.

Pour atteindre cet objectif, le troisième axe de recherche de ma thèse a consisté à identifier de nouveaux gènes codants pour des enzymes qui jouent un rôle dans la production des furocoumarines.

Comme il a été mentionné plus tôt dans ce manuscrit, la voie de biosynthèse des furocoumarines fait principalement appel à des enzymes de la famille des cytochromes P450s qui sont regroupées sous forme de clan (Bak *et al.*, 2011). Chez les plantes, le « clan 71 » regroupe des enzymes souvent engagées dans la biosynthèse des métabolites secondaires (Nelson *et Werck-Reichhart* 2011). C'est notamment le cas des enzymes connues à ce jour et qui utilisent les furocoumarines et les coumarines comme substrat (CYP71AJ, CYP71AZ, CYP82).

Avec le développement et la démocratisation des méthodes de séquençage à haut débit, de nombreuses données de génomiques sont maintenant disponibles. Les annotations faites dans ces bases de données reposent notamment sur les motifs peptidiques conservés. Elles ont permis de révéler des centaines de P450 orphelins dont la fonction reste généralement non identifiée. Pour ce qui concerne les agrumes, seuls les génomes de la clémentine (*C. clementina*) et de l'orange douce (*C. sinensis*) sont disponibles (G. A. Wu *et al.*, 2014; Q. Xu *et al.*, 2013). Dans ces génomes, 296 et 202 P450s ont été identifiés et parmi eux, respectivement 207 et 188 sont affiliés au clan 71 (Mittapelli, Maryada, Khareedu, & Vudem, 2014).

Dans le cadre ce travail de thèse, j'ai focalisé ma recherche de gènes candidats sur trois familles de P450s seulement : CYP82, CYP71 et CYP76. Le choix de ces familles de P450s a été réalisé sur la base 1) d'analyses de données bibliographiques (P450s de la même famille décrits comme étant impliqués dans la synthèse de furocoumarines, de coumarines ou de molécules analogues) et 2) d'analyses phytochimiques ou transcriptomiques différentielles chez des agrumes producteurs ou non producteurs de furocoumarines.

## **1. Recherche de gènes candidats dans la famille CYP82**

### **1.1. Éléments de Contexte**

Les travaux réalisés depuis plus de 10 ans au LAE ont montré que chez les *Apiacées*, plusieurs étapes de la voie de biosynthèse de furocoumarines étaient catalysées par des P450s de la sous famille CYP71AJ. En 2007 et en 2009, Larbat et ses collaborateurs ont mis en évidence que CYP71AJ1 et CYP71AJ3 jouaient un rôle dans la synthèse de psoralène et d'angélicine, respectivement. Plus récemment, Krieger et ses collaborateurs ont montré que la sous famille CYP71AZ était quant à elle impliquée dans la synthèse des furocoumarines et plus particulièrement dans l'hydroxylation du psoralène ou encore de la xanthotoxine. Ces mêmes auteurs ont également montré que d'autres CYP71AZ intervenaient dans l'hydroxylation de coumarines et ont émis l'hypothèse d'un processus évolutif liant les coumarines et les furocoumarines (Krieger *et al.* 2018).

De manière intéressante, des travaux publiés en 2008 par Kruse et ses collaborateurs ont montré que CYP82C2 et CYP82C4, enzymes produites par *A. thaliana* Col O, étaient également capables de catalyser *in vitro* la transformation de xanthotoxine en 5-hydroxy-xanthotoxine et ce, bien qu'*A. thaliana* ne produise pas de furocoumarines. La pertinence de ce résultat a été renforcée par les travaux réalisés dans le cadre de la thèse d'Audray Dugrand-Judek qui a démontré que CYP82D64, un P450 d'agrumes était en mesure de réaliser le même type de réaction. A noter que Dugrand-Judek a aussi démontré que CYP82D64 acceptait l'herniarine comme substrat pour produire la 5-hydroxy-7-methoxycoumarine.

Partant de ce constat, nous avons émis l'hypothèse, qu'à l'image de la famille CYP71 pour les apiacées, il était possible que la famille CYP82 soit responsable de la synthèse d'autres furocoumarines chez les agrumes.

### **1.2. Recherche de gènes candidats de la famille des CYP82 dans le génome annoté de *C. clementina* et *C. paradisi* dans la base de données Phytozome**

Phytozome est une base de données du Joint Genome Institut dans laquelle on trouve des données génomiques correspondant à plus de 90 plantes différentes. Ces

génomés ont été annotés en utilisant les outils bioinformatiques KOG, KEGG, ENZYME, Pathway et InterPro. Cette approche a permis d'identifier des P450s candidats sur la base de la présence de séquences consensus. Cette analyse, n'est cependant pas assez fine pour déterminer leur appartenance à une sous famille donnée.

Pour restreindre le nombre de gènes candidats, je me suis focalisé dans un premier temps sur les séquences codantes ayant des similarités de structure primaire permettant aux CYP450s candidats de les affilier à la sous famille CYP82. Pour cela, une recherche par homologie de séquence (BlastN et tBlastX) a été effectuée dans les génomes de *C. clementina* et de *C. sinensis* en utilisant comme cible les séquences peptidiques et nucléotidiques de CYP82C2, CYP82C4 et CYP82D64. Cette première approche a permis d'identifier 79 séquences nucléotidiques plus ou moins proches de séquences nucléotidiques correspondant à des CYP82. D'après Nelson et Werck-Reichhart (2011) deux P450 de plantes appartiennent à la même famille s'ils ont plus de 40% d'identité entre eux. En se basant sur ce critère de criblage, 42 séquences appartenant à la famille des CYP82 ont été identifiés, dont 16 sont d'orange et 26 de clémentine. Sur ces 42 séquences, j'ai sélectionné celles qui présentaient une similarité supérieure à 55% par rapport aux CYP82C et CYP82D réduisant ainsi le nombre de gènes à 11 candidats (matrice d'identité en Annexe 4). Une analyse fine de ces séquences a également indiqué que parmi les 11 séquences identifiées, 3 correspondaient à des gènes identiques dans les 2 variétés de *Citrus*. Toutes les séquences ont des introns, ce qui indique qu'elles sont des paralogues issues des événements de duplication et non de rétroposition.

| Code | Nom de la séquence nucléotidique sur Phytozome |                        | Source           |
|------|--|------------------------|------------------|
|      | <i>Citrus clementina</i>                       | <i>Citrus sinensis</i> |                  |
| Cit1 | Ciclev10030381m                                | -                      | BLAST            |
| Cit2 | Ciclev10030016m                                | -                      | BLAST            |
| Cit3 | Ciclev10028201m                                | orange1.1g010622m      | Thèse A. Dugrand |
| Cit4 | Ciclev10000845m                                | orange1.1g009786m      | BLAST            |
| Cit5 | Ciclev10000846m                                | -                      | BLAST            |
| Cit6 | Ciclev10003803m                                | orange1.1g036812m      | BLAST            |
| Cit7 | -  | orange1.1g009347m      | BLAST            |
| Cit8 | -  | orange1.1g046041m      | BLAST            |

**Tableau 3. Liste des séquences candidates codant pour des enzymes de la famille CYP82 potentiellement impliquées dans la biosynthèse des furocoumarines chez les agrumes.**

La base de données Phytozome nous a donc permis de sélectionner 8 séquences issues de la recherche par homologie des structures de séquences codantes (CDS) (dont une est la séquence décrite par A. Dugrand) (Tableau 3). Pour faciliter la lecture du manuscrit, les séquences identifiées ont été renommées en leur assignant le code Cit1 à Cit8.

### **1.3. Recherche de gènes candidats de la famille des CYP82 par une approche d'analyse de banques RNAseq.**

Le génome n'est pas forcément représentatif des gènes qui sont exprimés dans la plante. J'ai donc réalisé une analyse de différentes banques d'expression disponibles dans la littérature scientifique pour compléter l'analyse des génomes. L'intérêt de cette seconde approche est qu'elle donne également accès à des données quantitatives reflétant l'expression des gènes dans des tissus ou des conditions particulières.

#### **1.3.1. Banque de Voo *et al.* 2012**

En 2012, Voo et ses collaborateurs ont publié des travaux basés sur l'utilisation d'une approche *microarray*. Ils mettent en évidence l'expression différentielle de gènes 1) dans des cellules épithéliales entourant les cavités huileuses de flavedo de fruits à différents stades de maturation et, 2) dans des cellules parenchymateuses d'albédo. Ces analyses transcriptomiques ont été complétées par une analyse phytochimique qui montre que les furocoumarines sont présentes en quantités plus importantes dans les cavités huileuses de flavedo en comparaison de l'autre tissu analysé, l'albédo.

Dans cette banque de données, les auteurs ont identifié 6 séquences nucléotidiques codantes annotées comme étant des P450 appartenant à la famille CYP82. Une analyse de ces différents gènes candidats m'a permis de constater que deux d'entre eux correspondaient à *CYP82D64* qui est la xanthotoxine hydroxylase étudiée par Audray Dugrand Judek dans le cadre de sa thèse (contig *Cit.29478* et *Cit.2373* dans la banque de Voo). Les travaux de Voo et al indiquent aussi que ce gène est exprimé jusqu'à 26 fois plus dans le tissu des cavités huileuses par rapport à l'albédo. L'analyse de l'expression de ce premier gène est en accord avec l'hypothèse que les gènes impliqués dans la synthèse des furocoumarines sont plus produits dans les tissus riches en furocoumarines.

Les 4 autres séquences annotées CYP82 sont différentes les unes des autres. Je leur ai attribué les noms Cit9 à Cit12 (Tableau 4). L'analyse que j'avais initialement réalisée sur les génomes de *C. clementina* et *C. sinensis* n'avait pas permis de les révéler. Une analyse ciblée en utilisant les contigs de la banque de Voo *et al.* a permis de combler cette lacune. Cit9 et Cit12 sont présents dans les 2 génomes, tandis que Cit10 et Cit11 ne sont présents que dans le génome de *C. sinensis*. *Cit9* est légèrement plus exprimé dans les cellules parenchymateuses quel que soit le stade de développement des fruits. *Cit10* est plus fortement exprimé dans les cellules épithéliales (qui ne contiennent que très peu de furocoumarines) que dans les cellules parenchymateuses lorsque le fruit a une taille de production optimale d'huiles essentielles (41mm). *Cit11* est légèrement plus exprimé dans les cellules parenchymateuses lorsque le fruit a une petite taille, mais quand le fruit arrive

à 41 mm, il présente un profil d'expression similaire à Cit10. La séquence Cit12 est complète dans le génome de la clémentine (Ciclev10000844m) et partielle dans le génome de l'orange (orange1.1g026655m, Tableau 4). Cette séquence partielle correspond à la séquence d'un gène indiqué comme homologue aux CYP82C. Ce gène est exprimé majoritairement dans les cellules épithéliales, avec un profil d'expression très similaire à CYP82D64.

| Code  | Nom de la séquence nucléotidique sur Phytozome |                              | Source                 |
|-------|--|------------------------------|------------------------|
|       | <i>Citrus clementina</i>                       | <i>Citrus sinensis</i>       |                        |
| Cit9  | Ciclev10000852m                                | orange1.1g009899m            | Voo <i>et al.</i> 2012 |
| Cit10 | -  | orange1.1g009844m            | Voo <i>et al.</i> 2012 |
| Cit11 | -  | orange1.1g012878m            | Voo <i>et al.</i> 2012 |
| Cit12 | Ciclev10000844m                                | orange1.1g026655m (partiale) | Voo <i>et al.</i> 2012 |

**Tableau 4. Liste des séquences candidates codantes pour des enzymes de la famille CYP82 impliqués dans la biosynthèse des furocoumarines chez les agrumes (suite).**

Ces séquences ont été identifiées à partir de données transcriptionnelles.

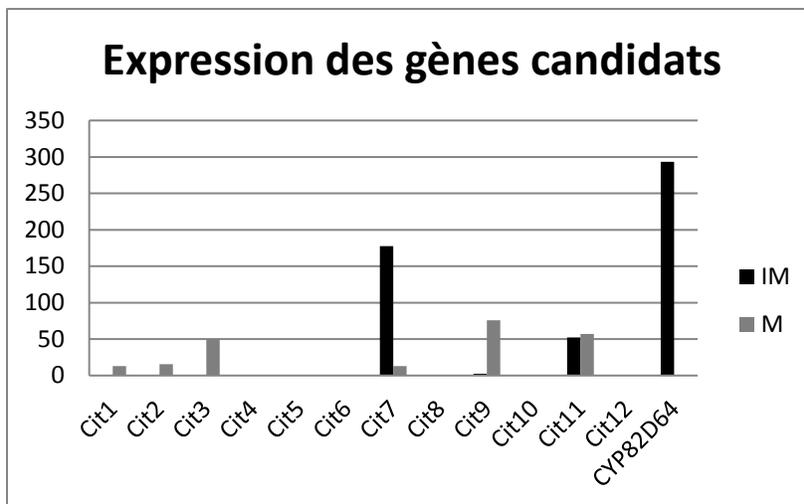
**En résumé,** 8 séquences candidates qui peuvent être des P450 impliqués dans la biosynthèse de furocoumarines chez les agrumes ont été identifiés par une approche de *data mining* dans des banques génomiques d'agrumes. Les informations complémentaires apportées par les travaux de Voo *et al.*, nous ont également permis d'identifier 4 séquences codantes additionnelles correspondant à des P450s de la famille CYP82. Leur expression est en corrélation avec la production de furocoumarines, sauf pour Cit9. J'ai poursuivi leur étude afin de mettre en évidence un éventuel processus évolutif similaire à celui décrit par Krieger *et al.* pour les P450s de la famille CYP71AZ (impliqués, pour rappel, dans la synthèse des furocoumarines et des coumarines).

### 1.3.2. Banque de Ryosuke Munakata

J'ai enfin réalisé une analyse d'une banque différentielle de RNAseq mise à disposition par le Dr. Ryosuke Munakata. Cette base de données non publiée a été établie à partir d'ARNm extraits de flavedo de fruits murs et immatures de *C. paradisi*. Le choix de ces tissus est basé sur la présence de furocoumarines qui est plus importante dans les tissus immatures, comme montré dans les travaux de thèse de Dugrand-Judek 2015.

L'analyse de ces banques (Figure 36) montre que *Cit1*, *Cit2*, *Cit3*, *Cit7*, *Cit9*, *Cit11* et *CYP82D64* sont exprimés dans l'une ou l'autre de ces banques. *Cit4*, *Cit5*, *Cit6*, *Cit8*, *Cit10* et *Cit12* par contre, ne sont pas mis en évidence. Cette observation est contradictoire avec les résultats de Voo *et al.* L'absence de ces gènes pourrait être liée à un niveau d'expression très faible. Par ailleurs, il faut noter que les travaux réalisés par les 2 auteurs font référence à des variétés de Citrus différentes.

Dans cette banque, CYP82D64 (i.e. la xanthotoxine hydroxylase) n'est présente que dans les tissus immatures. Sur l'ensemble des gènes candidats analysés, seul *Cit7* présente le même profil d'expression.



**Figure 36. Expression de l'ARNm des séquences candidates codantes pour des CYP82.** Analyse réalisé dans la banque de RNAseq de flavedo de *C. paradisi* des fruits matures (M) et immatures (IM) fourni par Ryosuke Munakata, postdoctorant au LAE. Les ordonnées sont exprimées en FPKM (Fragments Per Kilobase Million), en dessous de 100, la séquence est considérée comme « présente » ou « absente », mais elle n'est pas quantifiable.

**Bilan de l'analyse de l'expression des gènes** – L'analyse des bases de données a permis d'identifier 12 nouvelles séquences codant pour des CYP82. Elle a de plus permis d'obtenir des informations sur l'expression de certains d'entre eux. Ces résultats ne sont pas forcément concordants d'une analyse à l'autre. Cette absence de cohérence m'a amenée à poursuivre l'analyse des 12 gènes candidats identifiés avec une attention toute particulière pour *Cit7*, *Cit10*, *Cit11* et *Cit12* dont le profil d'expression concorde avec celui de la xanthotoxine hydroxylase décrite par Dugrand-Judek.

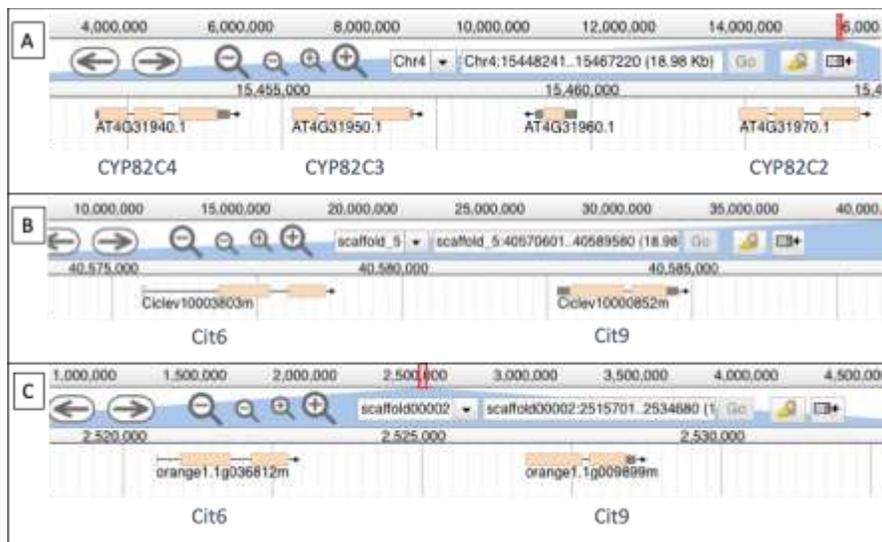
## 1.4. Organisation génomique des gènes codants pour les CYP82 chez les agrumes

### 1.4.1. Vers une organisation en cluster ?

Des travaux réalisés au cours de ces dernières années ont mis en évidence que les gènes codant pour des enzymes impliquées dans une même voie de biosynthèse du métabolisme spécialisé chez les plantes pouvaient être organisés en clusters (Kliebenstein & Osbourn, 2012). Certains de ces clusters peuvent contenir plusieurs copies de variants de P450s issus de duplications suivi d'une néofonctionalisation. Cette évolution a ainsi permis de modifier ou de créer des voies de biosynthèse et d'augmenter la diversité des métabolites produits par les plantes (Hamberger & Bak, 2013). Roselli *et al.* (2017) ont montré deux organisations en clusters, une notamment avec *CYP71AJ3* et *CYP71AJ4* sur un

chromosome et *PsPT1* et une dioxygénase synthétisant l'umbelliférone sur un autre chromosome. L'analyse du génome d'*Arabidopsis* indique que les gènes *CYP82C2*, 3 et 4 d'*A. thaliana* sont regroupés sur une distance d'environ 10 000 paires de bases sur le chromosome 4 (Figure 37A). Avec une identité peptidique supérieure à 88%, les 3 protéines correspondantes sont très proches les unes des autres. Les fonctions de *CYP82C2* et 4 sont associées à la synthèse de 5-hydroxy-xanthotoxine et, dans le cas de *CYP82C4* à celle de la fraxétine. Ces fonctions sont très proches de celles décrites pour les *CYP71AZ*. En revanche, à ce jour aucune fonction n'a été identifiée pour *CYP82C3* qui porte une délétion de 11 acides aminés par rapport à *CYP82C2* et 4 sur une région importante pour la fixation du substrat (Liu et al., 2010).

Afin de voir si une telle structuration existe chez les agrumes, j'ai recherché la localisation génomique de chacune des séquences codantes *Cit1* à *12* sur les génomes des 2 variétés de citrus dont des données génomiques sont disponibles. Les génomes de citrus ne sont pas entièrement consolidés et la structure des chromosomes n'est pas établie dans son intégralité. Cependant des fractions de génome ont été assemblées donnant ainsi une trame potentielle du génome (on parle de *scaffold*). Cette analyse m'a permis de montrer que seuls ***Cit6* et *Cit9* étaient physiquement proches** puisqu'ils ne sont distants que de 5 000 paires de bases, et ce, à la fois chez *C. sinensis* et *C. clementina* (Figure 37B et C). À noter que *Cit6* est la séquence la plus proche aux *CYP82C* d'*Arabidopsis* et elle a été décrite comme un possible orthologue de celle-ci alors qu'elle n'a jamais été clonée ni caractérisée biochimiquement (Rajniak et al., 2018).



**Figure 37. Organisation génomique des gènes de la famille CYP82.**

Les gènes *CYP82C2*, 3 et 4 sont organisés en cluster sur le brin positif du chromosome 4 d'*A. thaliana* (A). Les gènes candidats *Cit6* et *Cit9* sont également organisés en clusters, les deux gènes sont séparés de 5000 pb dans le *scaffold* 5 du génome annoté de *C. clementina* (B) et dans le *scaffold* 2 du génome annoté de *C. sinensis* (C). Images générées dans JBrowse sur le site Phytosome

L'analyse des autres gènes candidats ne permet pas d'établir de liens physiques entre eux. Mais cette hypothèse ne peut être exclue au vu de la robustesse de l'assemblage des génomes disponibles.

#### 1.4.2. Structure génique des séquences candidates

La structure génomique des P450 du clan CYP71 est généralement bien conservée. Ils contiennent généralement un seul intron conservé en phase 0 (qui tombe entre deux codons), appelé intron « M » (Paquette et al 2000; Bak *et al.* 2011). Dans certains cas, ils peuvent néanmoins aussi avoir d'autres introns moins conservés. C'est le cas par exemple de CYP82C2, 3 et 4 qui en contiennent un deuxième.

Dans le cas des gènes candidats identifiés chez Citrus, on ne trouve qu'un seul intron. Cependant, on constate une différence assez nette entre les différents gènes pour ce qui concerne sa localisation et sa taille (Tableau 5) ce qui pourrait être une source d'information quant à leur apparition au cours de l'évolution, voire de leur filiation. La plupart des gènes ont des introns qui démarrent aux alentours de la position 950 mais leur taille est très variable : elle peut aller de 94 nt pour *Cit11* jusqu'à 1004 nt pour *Cit12*. Dans le cas de *Cit11*, la taille de la protéine correspondante prédite n'est que de 454 AA ce qui est 10 % inférieur à la taille classique d'un P450. En réalisant des alignements, on constate que pour *Cit11*, ainsi que pour *Cit1*, il manque la région N-terminal et C-terminal, respectivement.

| Séquence        | Taille du gène | Début de l'intron  | Fin de l'intron      | Taille de l'intron  | Taille de la CDS | Taille de la protéine |
|-----------------|----------------|--------------------|----------------------|---------------------|------------------|-----------------------|
| <b>Cit1</b>     | 1771           | 955                | 1262                 | 307                 | 1464             | 488                   |
| <b>Cit2</b>     | 1883           | 955                | 1263                 | 308                 | 1575             | 525                   |
| <b>Cit3</b>     | 2013           | 952                | 1446                 | 441                 | 1572             | 524                   |
| <b>Cit4</b>     | 2259           | 955                | 1677                 | 685                 | 1574             | 525                   |
| <b>Cit5</b>     | 2355           | 955                | 1842                 | 780                 | 1575             | 525                   |
| <b>Cit6</b>     | 3150           | (1) 59<br>(2) 2196 | (1) 1315<br>(2) 2525 | (1) 1256<br>(2) 329 | 1565             | 522                   |
| <b>Cit7</b>     | 2374           | 991                | 1942                 | 863                 | 1511             | 504                   |
| <b>Cit8</b>     | 2438           | 973                | 1816                 | 843                 | 1595             | 532                   |
| <b>Cit9</b>     | 1681           | 949                | 1268                 | 113                 | 1568             | 523                   |
| <b>Cit10</b>    | 2269           | 952                | 1650                 | 698                 | 1571             | 524                   |
| <b>Cit11</b>    | 1455           | 742                | 848                  | 94                  | 1361             | 454                   |
| <b>Cit12</b>    | 2579           | 955                | 1959                 | 1004                | 1575             | 525                   |
| <b>CYP82D64</b> | 2316           | 946                | 1724                 | 736                 | 1580             | 527                   |

**Tableau 5. Position des introns des séquences candidates et du CYP82D64.**

Tous les séquences dans ce tableau contiennent un seul intron en phase 0 sauf Cit6, qui contient deux introns (1) en phase 1 et (2) en phase 2.

Parmi les gènes sélectionnés, Cit6 est un cas à part car c'est le seul qui renferme deux introns de phase 1 (qui tombe entre le premier et deuxième nucléotide d'un codon, Tableau X). Le positionnement et la taille du second intron est assez classique (environ 950

nt après le début de la séquences nucléotidique). Le premier, par contre, n'existe chez aucun autre candidat. Cet intron est présent dans les deux génomes disponibles.

**Bilan :** L'analyse de la structure génétique des différentes séquences candidates indique que *Cit6* et *Cit9* sont très proches physiquement l'un de l'autre. Mais leur analyse fine révèle que *Cit6* est sans doute un pseudogène. Les autres gènes n'ont pas de structure originale et restent des candidats potentiels pour jouer un rôle dans la synthèse des furocoumarines (ou éventuellement de coumarines).

## 1.5. Analyse des séquences peptidiques

### 1.5.1. Analyse phylogénétique de la famille des CYP82

Pour avoir une vision plus précise des P450s candidats ainsi identifiés dans le paysage global des cytochromes P450 de la sous famille CYP82, j'ai réalisé une banque de séquences peptidiques avec des séquences collectées à partir

- i) de la base de données « Cytochromes P450 homepage » de David Nelson (<https://drnelson.uthsc.edu/cytochromeP450.html>),
- ii) de la base de données KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) et,
- iii) de la banque de P450 récemment annotée pour *Vitis vinifera* (Ilc et al., 2018).

J'ai retiré de cette base de données ainsi formée les séquences partielles et également celles annotées comme correspondant à des pseudogènes. Cette base de données ainsi constituée contient 91 séquences peptidiques correspondant à des cytochromes P450 de la famille CYP82 et a été utilisée pour réaliser une analyse phylogénétique. Pour enraciner cet arbre j'ai ajouté 11 séquences correspondant à des P450 de la famille des CYP71 ou CYP83. Ces P450s appartiennent également au Clan 71.

D'un point de vue méthodologique, j'ai réalisé un premier alignement des séquences sélectionnées en utilisant l'algorithme MUSCLE du logiciel UGENE. Cette étape préliminaire m'a permis d'identifier et de supprimer les régions extrêmement variables qui créaient des *gaps* de 90 % des acides aminés dans l'alignement. J'ai également supprimé l'ancre membranaire N-terminal et la région C-terminal à cause de leur faible niveau de conservation chez les P450. Une fois l'alignement homogénéisé, l'analyse phylogénétique a été effectuée avec l'outil en ligne Phylogeny ([www.phylogeny.fr](http://www.phylogeny.fr), Dereeper *et al.* 2008) selon la méthode du maximum likelihood et le modèle JTT. Pour stabiliser la construction j'ai réalisé un *boostsrapping* de 100 itérations. Aucune curation des séquences n'a été réalisée par Phylogeny.

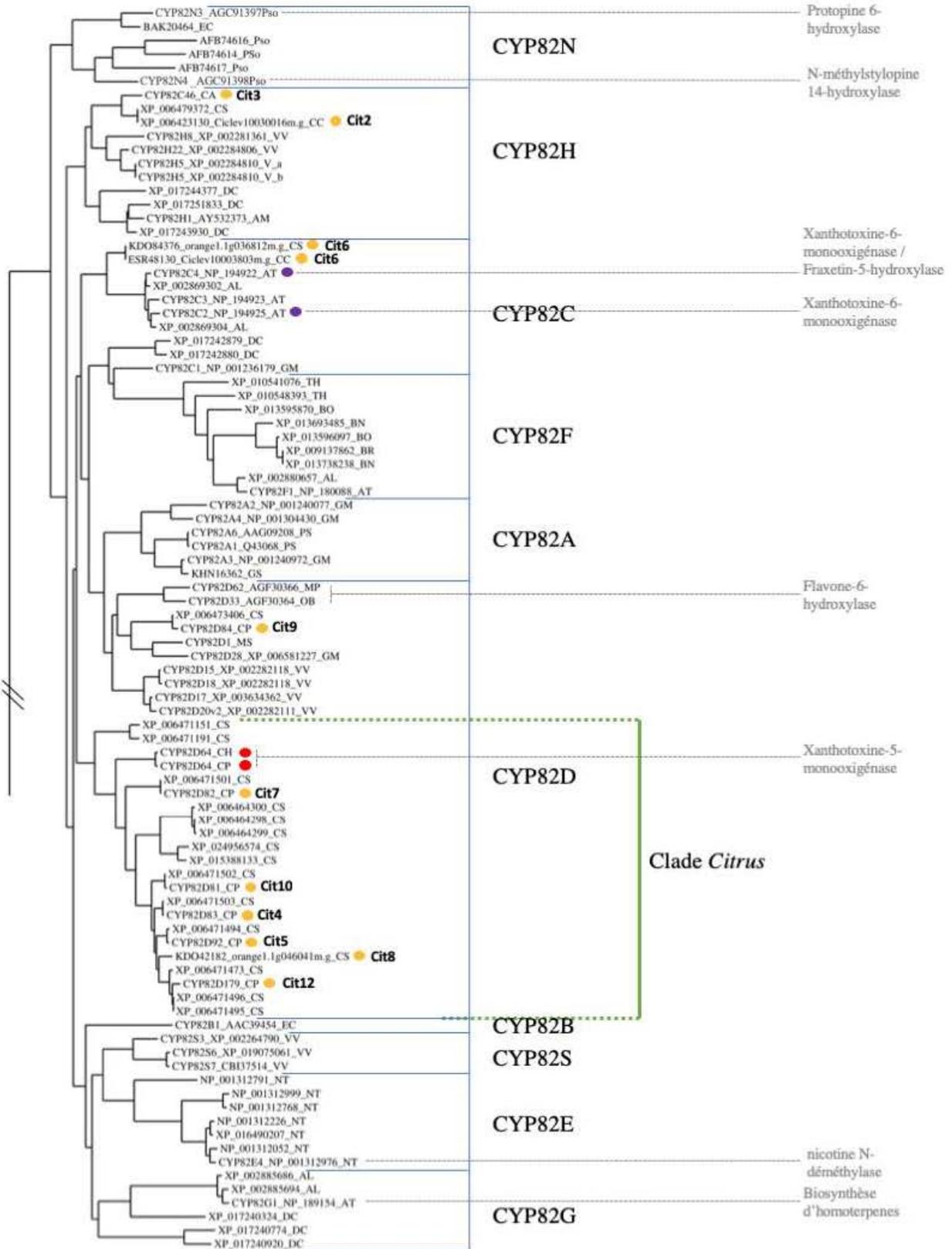
L'analyse bibliographique réalisée sur la famille CYP82 indique une diversité fonctionnelle relativement étendue sur des familles de molécules ayant des structures chimiques très différentes comme des alcaloïdes, des terpènes ou encore des composés phénoliques. Par exemple, les enzymes CYP82N3 et CYP82N4 de *Papaver somniferum* hydroxylent des benzyloquinolines alcaloïdes (Beaudoin & Facchini, 2013). CYP82E4 de *Nicotiana tabacum* correspond à une nicotine N-déméthylase (Siminszky *et al.* 2005). CYP82G1 d'*A. thaliana* est impliqué dans la synthèse d'homoterpènes volatiles (Lee *et al.*, 2010). CYP82D63 de *Mentha piperita* et CYP82D33 de *Ocimum basilicum*, hydroxylent les flavones (Berim & Gang, 2013); CYP82D64 de *C. paradisi* et CYP82C2 d'*A. thaliana* hydroxylent la xanthotoxine et CYP82C4 hydroxyle la fraxetine. Cette diversité fonctionnelle est répartie sur l'ensemble de l'arbre généré (Figure 38).

L'analyse phylogénétique des CYP82 candidats met en lumière un regroupement des CYP82D de *Citrus*. CYP82D64 et les séquences Cit4, Cit5, Cit7, Cit8, Cit10 et Cit12 sont réunies en un clade. Ce regroupement pourrait donner des indications sur la fonction des enzymes et renforce les hypothèses de travail initiales (pour rappel, CYP82D64 est une xanthotoxine hydroxylase). Cit6, par contre, est très proche des CYP82C2 et C4. Enfin, Cit9 est très proche de CYP82D62 et CYP82D33 et pourrait de fait être préférentiellement impliquée dans le métabolisme des flavonoïdes, ce qui est cohérent avec l'analyse de la structure peptidique, où *Cit9* présente moins d'acides aminés conservés que le reste des structures primaires du clade des CYP82D (Annexe 7).

FIGURE SUR LA PAGE SUIVANTE

**Figure 38. Arbre phylogénétique construit avec des séquences peptidiques de la famille des CYP82.**

Les séquences candidates sont identifiées par un cercle orange. Les séquences identifiées par un cercle rouge et en violet correspondent aux enzymes impliquées dans la métabolisation des coumarines et/ou furocoumarines chez les *Citrus* et *A. thaliana*. L'arbre a été construit sur le site phylogeny.fr avec la méthode Maximum likelihood (PhyML). L'alignement a été réalisé avec MUSCLE en utilisant les paramètres par défaut. Les régions très variables créant des gaps ont été enlevées, ainsi que la région C-terminal et la région membranaire N-terminal. Racine de l'arbre : 11 séquences des CYP71 et CYP83. 100 itérations ont été construites, les valeurs bootstrap se trouvent sur l'arbre complet en Annexe 7. Légende : AA, *Ammi majus* ; AL, *Arabidopsis lyrata* ; AT, *Arabidopsis thaliana* ; BN, *Brassica napus* ; BR, *Brassica rapa* ; BO, *Brassica oleracea* ; CA, *Citrus aurantium* ; CC, *Citrus clementina* ; CS, *Citrus sinensis* ; DC, *Daucus carota* ; EC, *Eschscholzia californica* ; GM, *Glycine max* ; GS, *Glycine soja* ; MS, *Medicago sativa* ; MP, *Mentha piperita* ; NT, *Nicotiana tabacum* ; OB, *Ocimum basilicum* ; PS, *Pisum sativum* ; PSo, *Papaver somniferum* ; SH, *Sinopodophyllum hexandrum* ; SR, *Stevia rebaudiana* ; TH, *Tarenaya hassleriana* ; VV, *Vitis vinifera*.



0.2

## **2.1 Clonage des séquences codantes**

Pour cloner les séquences codantes des différents gènes candidats, j'ai été amenée à prendre en compte un certain nombre d'éléments :

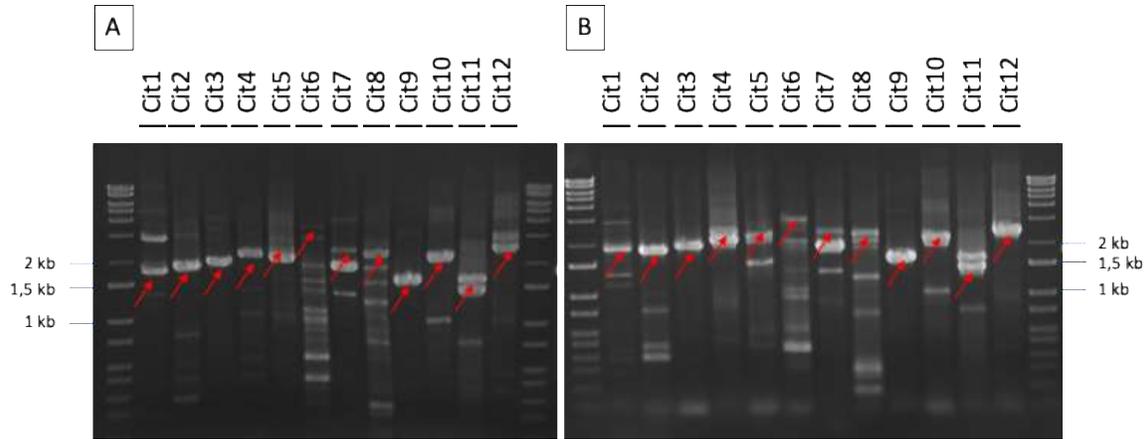
- iv) l'analyse génomique a mis en évidence que tous les gènes ciblés contenaient des introns. Un clonage à partir d'ADN génomique peut de fait être plus compliqué car nécessiterait une approche en plusieurs étapes.
- v) les analyses réalisées sur les banques RNAseq indiquent que certains gènes sont exprimés à des niveaux très faibles. Cela doit être pris en compte en réalisant des extractions d'ARNm de très bonne qualité à partir de tissus d'agrumes produisant des furocoumarines
- vi) l'identification des séquences codantes a été réalisée à partir de bases de données provenant de variétés d'agrumes différentes (*C. paradisi*, *C. sinensis* et *C. clementina*). Il est donc possible que les séquences ne soient pas identiques à 100 % d'une plante à une autre. Pour pallier ce problème potentiel j'ai travaillé avec le matériel génétique de *C. paradisi* (pomelo) Star Ruby qui est la variété qui a fait l'objet des travaux des parties 1 et 2 des résultats. J'ai également utilisé le matériel génétique de la variété Ruby et *Citrus hystrix* (combava). Enfin, j'ai utilisé *C. reticulata* (mandarine) comme témoin négatif. A noter qu'une des séquences (*Cit3*) correspond à un P450 qui avait déjà été cloné à partir de *C. auranthium* dans le cadre de la thèse d'Audray Dugrand mais dont la fonction n'avait pas été identifiée jusque-là, je n'ai donc pas repris ce gène.

L'objectif final est de produire les protéines correspondantes dans la levure. Pour chaque séquence codante j'ai défini des amorces avec une température d'hybridation allant de 54 à 56 °C (amorces en Annexe 5). Afin de pouvoir vérifier si la protéine recombinante est exprimée efficacement, j'ai ajouté une séquence de 6 codons CAT surnuméraires avant le codon stop. Cette queue de 6 histidines permettra de mettre en évidence l'expression de la protéine recombinante par immunodétection.

Afin de tester la spécificité des amorces, j'ai réalisé une première amplification sur de l'ADN génomique de pomelo Star Ruby et de mandarine. Cette étape préliminaire avait pour objectif de m'affranchir d'éventuelles différences de séquences. L'amplification a été réalisée par PCR avec une enzyme spécifiquement développée pour du tissu végétal et contenue dans le kit KAPA3G Plant DNA polymérase (KAPA BIOSYSTEMS).

Les profils obtenus après amplification sont très hétérogènes en termes de spécificités (Figure 39). Les profils d'amplification obtenus pour les ADNg de pomelo et de mandarines sont similaires. Ils sont spécifiques pour *Cit2*, *3*, *4*, *5*, *9* et *10* et permettent

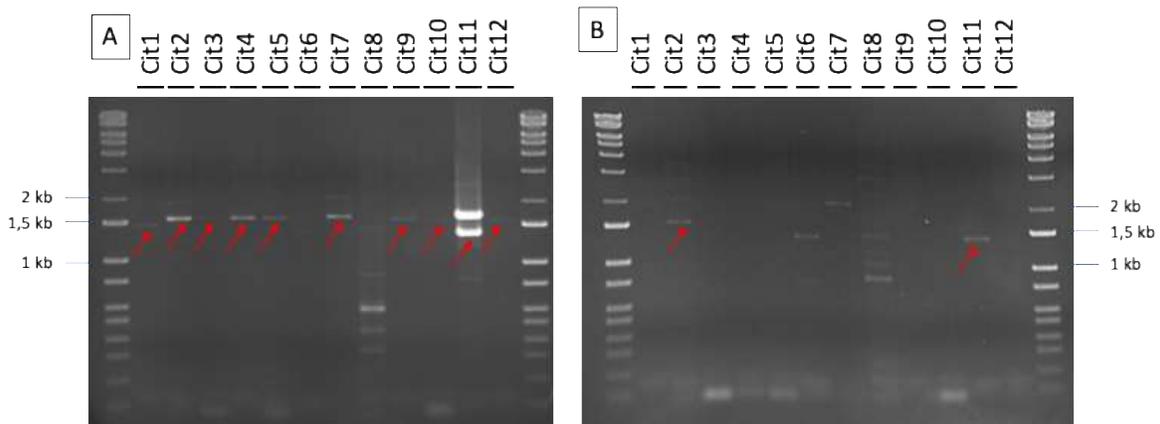
d'obtenir des fragments uniques de la taille attendue d'environ 2 kb. Dans le cas de *Cit1*, *6*, *7*, *8*, *11* et *12*, ces amplifications sont aspécifiques et de nombreuses bandes sont générées. Néanmoins, une bande correspondant à la taille attendue est à chaque fois présente.



**Figure 39. Vérification des amorces sur l'ADN génomique.**

Amplification des séquences candidates sur l'ADNg de *C. paradisi* var. Star Ruby (A) et *C. reticulata* (B). Les flèches rouges indiquent les bandes correspondant à la séquence candidate en haut de l'image.

En me basant sur ces expérimentations préliminaires j'ai entrepris l'amplification des séquences codantes à partir d'ARNm totaux extraits de flavedo de ces mêmes plantes (Figure 40). La PCR a permis d'amplifier des fragments de 1,5 kb pour toutes les séquences chez le pomelo hormis *Cit6* et *Cit8*. En revanche, pour la mandarine, seuls *Cit2* et *Cit11* ont été amplifiés. La mandarine est un agrume faiblement producteur de furocoumarines (Dugrand-Judek et al., 2015). Ce résultat indique qu'il est possible que les gènes exprimés chez le pomelo soient impliqués dans la production des furocoumarines et de ceux chez les mandarines plutôt dans la synthèse de coumarines.



**Figure 40. Expression transcriptomique des séquences candidates de la famille CYP82.**

Amplification des séquences candidates à partir du cDNA de *C. paradisi* var. Star Ruby, producteur de furocoumarines (A) ; et *C. reticulata* non producteur de furocoumarines (B). Les flèches rouges indiquent les bandes correspondant à la séquence candidate indiquée en haut de l'image.

| Séquence candidate | Annotation | À partir de l'espèce                  | CDS cloné vs séquence candidate (Identité) |
|--------------------|------------|---------------------------------------|--|
| Cit1               | CYP82C49   | <i>Citrus paradisi</i>                | 98 %                                       |
| Cit3               | CYP82C46   | <i>Citrus aurantium</i>               | 99 %                                       |
| Cit4               | CYP82D83   | <i>Citrus paradisi</i>                | 99 %                                       |
| Cit5               | CYP82D92   | <i>Citrus paradisi</i>                | 98 %                                       |
| Cit7               | CYP82D82   | <i>Citrus paradisi</i>                | 100 %                                      |
| Cit9               | CYP82D84   | <i>Citrus paradisi</i>                | 98 %                                       |
| Cit10              | CYP82D81   | <i>Citrus paradisi/Citrus hystrix</i> | 97 %                                       |
| Cit11              | CYP82D27   | <i>Citrus paradisi</i>                | 91 %                                       |
| Cit12              | CYP82D179  | <i>Citrus paradisi</i>                | 94 %                                       |

**Tableau 6. Séquences codantes candidates clonées dans un plasmide permettant de faire de l'expression hétérologue dans la levure.**

La première et la deuxième colonne indique les séquences candidates identifiées sur Phytozome et leur annotation assignée par le comité de nomenclature. La troisième colonne montre l'espèce à partir de laquelle la séquence codante a été clonée et finalement la dernière colonne montre l'identité entre la séquence retrouvée dans les banques des données et sur la séquence clonée.

Les produits de PCR ont été clonés et séquencés. Les séquences obtenues présentent certaines différences avec les séquences mises en évidence dans les bases de données ce qui n'est pas surprenant (Tableau 6) et révèle une certaine variabilité génétique d'une espèce à l'autre. Les 9 séquences clonées ont été annotées par le comité de nomenclature pour les P450 (D. R. Nelson, 2009). La plupart des séquences candidates correspondent à des enzymes de la sous famille des CYP82D à l'exception de Cit1 et Cit3 qui appartiennent à la sous famille des CYP82C (Tableau 6, Deuxième colonne).

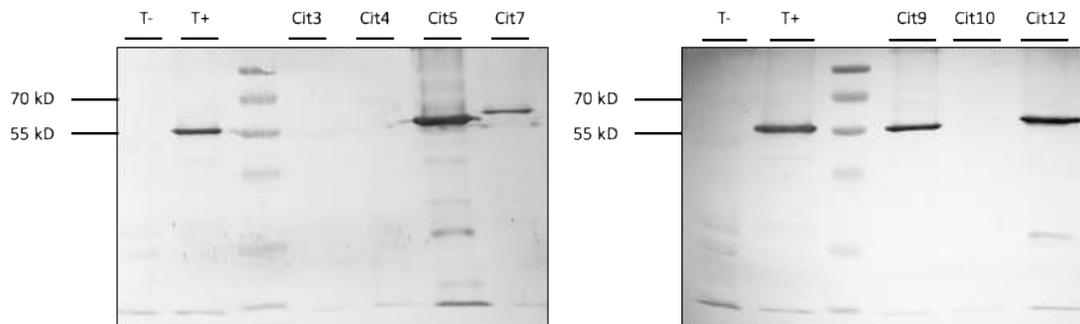
### 1.6. Expression hétérologue des CYP82 clonés et criblages métaboliques

Les cytochromes P450 de végétaux sont des protéines ancrées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique par une queue N-terminal d'une cinquantaine d'acides aminés. Ils doivent être associés de manière non covalente à une NADPH P450 réductase qui permet le transfert d'électron vers le site actif des P450. Le système d'expression hétérologue utilisé au laboratoire pour produire ces protéines est celui développé par Denis Pompon en 1996 qui repose sur l'utilisation de *Saccharomyces cerevisiae* (Pompon *et al.* 1996). Il s'agit d'un système d'expression transitoire inductible permettant en parallèle de réaliser une surexpression des P450s et d'une réductase d'*A. thaliana* (ATR1).

Le plasmide répliquatif utilisé dans l'unité est un plasmide dérivé de pYeDP60 dans lequel il a été introduit une cassette de clonage GATEWAY-compatible. Le clonage des gènes d'intérêt est réalisé par recombinaison entre des plasmides pCR8 recombinants et le

plasmide pYeDP60. La transformation de levures WAT11 se fait par choc thermique et la sélection sur un milieu ne contenant pas d'Uracile.

Les cytochromes P450s sont connus pour être des protéines relativement difficiles à produire. Avant de réaliser un criblage fonctionnel, il est nécessaire de vérifier que ces enzymes sont bien produites. Les P450s étant des protéines membranaires, celles-ci ne peuvent être purifiées en l'état. Pour faire un criblage fonctionnel *in vitro*, on prépare des extraits membranaires appelés microsomes. Pour caractériser la production de la protéine recombinante, deux approches peuvent être envisagées. La première consiste à réaliser un spectre différentiel à 450 nm en présence de monoxyde de carbone et de dithionite de sodium. Cette méthode de référence permet non seulement de voir si le P450 est présent, mais elle permet également de savoir s'il est correctement replié au niveau de son noyau hémique. Cette méthode permet d'estimer également sa concentration dans la préparation microsomale. Malheureusement, si cette approche fonctionne avec certains P450s décrits dans la littérature, elle n'a jamais donné les résultats escomptés avec les différents P450s étudiés ici. La seconde méthode consiste à réaliser une immunodétection par western blot des protéines produites, immunodétection qui est rendue possible grâce à la présence de la queue poly-histidine ajoutée à l'extrémité C-terminal de toutes les protéines lors du clonage.



**Figure 41. Western blot réalisés sur des microsomes de levures WAT11 transformées avec le pYeDP60 contenant les séquences candidates de la famille de CYP82.**

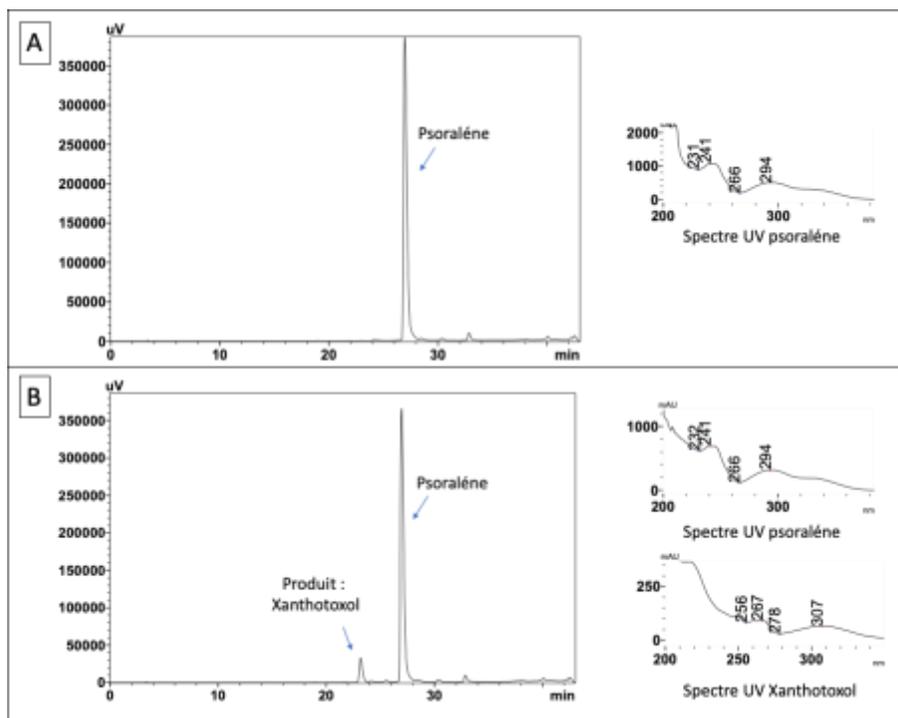
L'immunodétection a été réalisée avec des anticorps de lapin Anti-HIS, spécifiques de la queue poly-histidines ajoutée à l'extrémité C-terminale des protéines. Les témoins négatif (T-) et positif (T+) correspondent aux levures transformées avec le pYeDP60 vide et le pYeDP60-CYP71AZ4, respectivement.

Les résultats obtenus indiquent que les protéines Cit5, Cit7, Cit9 et Cit12 sont correctement exprimées (Figure 41). Les poids moléculaires apparents des protéines Cit5, 9 et 12 obtenues correspondent à la taille théorique attendue qui est de l'ordre de 50 kDa. Dans le cas de Cit7, la protéine produite a un poids moléculaire apparent sensiblement plus grand par rapport à ce qui est attendu. On constate également la présence de protéines de poids moléculaires plus faible qui peuvent potentiellement correspondre à des produits de

dégradation. Les protéines Cit3, 4 et 10 n'ont jamais pu être produites dans les conditions utilisées au laboratoire.

### 1.6.1. Criblage fonctionnel

Pour réaliser la caractérisation fonctionnelle des différents cytochromes P450, l'approche la plus classiquement mise en œuvre consiste à préparer des microsomes à partir de levures en culture liquide, puis à effectuer des tests de métabolisation *in vitro*. Pour cela, les microsomes sont incubés en présence de 200  $\mu$ M de différents substrats potentiels et de NADPH qui est un cofacteur nécessaire pour réaliser le transfert d'électron *via* la NADPH P450 réductase. Les substrats sont utilisés à une concentration initiale assez importante permettant ainsi de mettre en œuvre des volumes très faibles et ainsi de limiter un éventuel impact négatif des solvants dans lesquels ces molécules sont préparées (DMSO ou méthanol).



**Figure 42. Chromatogramme HPLC-UV de la métabolisation de psoralène en xanthotoxol par des microsomes de levures transformés avec CYP71A24.**

Témoin négative (A), mélange des microsomes avec du psoralène sans NADPH. Mélange réactionnel des microsomes avec NADPH (B).

La réaction est généralement réalisée à 28 °C pendant 20 min. Afin de vérifier que les substrats ne sont pas métabolisés par des enzymes endogènes de levure et pour montrer que la réaction est bien NADPH dépendante, 3 contrôles sont réalisés lors de chaque expérimentation. Le premier consiste à faire chaque incubation en présence et en absence

de NADPH. Le second contrôle consiste à faire des incubations avec des microsomes préparés à partir de levures transformées avec un plasmide pYeDP60 vide. Un troisième contrôle est réalisé avec la métabolisation d'une molécule donnée par un cytochrome P450 témoin. Ce dernier contrôle permet de vérifier que le protocole de préparation des levures n'a pas altéré les microsomes et que le NADPH utilisé est fonctionnel (il est rapidement oxydable en NADP<sup>+</sup>). Dans mon cas, j'ai utilisé comme contrôle positif une préparation de microsomes contenant CYP71AZ4 qui est capable de transformer le psoralène en xanthotoxol (Figure 42). Ce contrôle est réalisé de manière systématique.

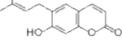
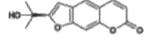
| Courmarines                      |   |                           |             | Furocoumarines |  |                           |            |
|----------------------------------|---|---------------------------|-------------|----------------|--|---------------------------|------------|
| Nom                              | Structure   | Poids moléculaire (g/mol) | Numéro CAS  | Nom            | Structure  | Poids moléculaire (g/mol) | Numéro CAS |
| 6-méthoxycoumarine               |    | 176,17                    | 17372-53-1  | Bergaptène     |   | 216,19                    | 298-81-7   |
| 7-méthoxy-coumarine (Herniarine) |    | 176,17                    | 531-59-9    | Bergaptol      |   | 202,17                    | 2009-24-7  |
| Daphnétiline                     |    | 178,14                    | 486-35-1    | Psoralène      |   | 186,16                    | 523-50-2   |
| Daphnétiline-7-méthyléther       |    | 192,17                    | 19492-03-6  | Xanthotoxine   |   | 216,19                    | 484-20-8   |
| Déméthylsubérosine               |   | 230,26                    | 21422-04-8  | Xanthotoxol    |  | 202,17                    | 486-60-2   |
| Esculétiline                     |  | 178,14                    | 305-01-1    |                |  |                           |            |
| Fraxétine                        |  | 208,17                    | 574-84-5    |                |  |                           |            |
| Isoscopolétine                   |  | 192,17                    | 776-86-3    |                |  |                           |            |
| Limettine                        |  | 206,20                    | 487-06-9    |                |  |                           |            |
| Marmésine                        |  | 246,28                    | 13849-08-06 |                |  |                           |            |
| Scoparone                        |  | 206,20                    | 120,08-1    |                |  |                           |            |
| Scopolétine                      |  | 192,17                    | 05-10-3067  |                |  |                           |            |
| Umbelliféron                     |  | 162,14                    | 93-35-6     |                |  |                           |            |

Figure 43. Coumarines et furocoumarines testées lors des criblages métaboliques.

Pour réaliser le criblage métabolique, les 4 P450s candidats pour lesquels une protéine a été mise en évidence ont été incubés en présence de 18 coumarines et furocoumarines issues de la chimiothèque de l'unité (Figure 43) qui comprend l'ensemble des intermédiaires de la voie de biosynthèse des furocoumarines, de nombreuses coumarines décrites chez les agrumes. Ce criblage est malheureusement resté non fructueux pour les 4 cytochromes P450s testés.

**En résumé :** Dans cette partie, j'ai été amenée à cloner 9 gènes codants pour des CYP82. Ces P450s ont été affiliés aux familles CYP82D et CYP82C par le comité de nomenclature des P450 et appartiennent donc à la même sous famille que la xanthotoxine hydroxylase CYP82D64, CYP82C2 et CYP82C4. Uniquement 4 de ces différentes protéines ont été produites avec succès dans la levure. Le criblage métabolique est cependant resté infructueux à ce jour. L'analyse phylogénétique des CYP82 a permis d'identifier de nouvelles séquences qui pourraient être intéressantes pour leur implication dans la voie des furocoumarines.

## **2. Recherche d'autres gènes candidats**

### **2.1. Éléments de contexte**

Comme je l'ai déjà évoqué à plusieurs reprises, ce sont des P450 de la famille CYP71 qui ont été décrits jusque-là comme étant impliqués dans la synthèse des furocoumarines chez les apiacées : CYP71AJ1-4 (*A. majus*, *A. graveolens*, *P. sativa*) (Larbat *et al.* 2007, 2009) et CYP71AZ1-4 (*P. sativa*) (Krieger *et al.*, 2018). Il m'a semblé important de suivre cette piste et de rechercher également des CYP71 jouant un rôle dans la production de ces molécules chez les agrumes. La démarche que j'ai utilisée est la même que pour l'identification des P450s de la famille CYP82.

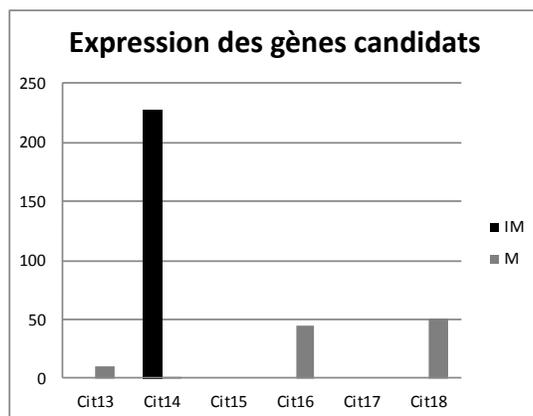
### **2.2. Recherche de gènes candidats affiliés à la famille des CYP71 dans le génome annoté de *C. clementina* et *C. paradisi* dans la base de données Phytozome**

La recherche de gènes orthologues dans les bases de données génomique en utilisant CYP71AJ et CYP71AZ comme sonde ne m'a permis d'identifier que 7 séquences présentant une identité nucléotidique supérieure à 50% avec les séquences sondes.

Ce résultat est particulièrement intéressant et instructif pour 2 raisons. Premièrement, le nombre de gènes codant potentiellement pour des CYP71 est faible au regard du nombre de gènes codants pour des P450s de la famille CYP82. Les CYP71 sont souvent décrits comme étant des P450s extrêmement variables, ce qui se reflète par le nombre de sous familles différentes (D. R. Nelson, 2009) et par les activités enzymatiques décrites dans la littérature. Dans le cas des agrumes, il semblerait que ce soit plutôt les CYP82 qui jouent le rôle de levier d'ajustement. La seconde constatation est que je n'ai pas pu mettre en évidence de gènes réellement orthologues de CYP71AJ et CYP71AZ dans les génomes d'agrumes étudiés. Ce résultat va dans le sens de la mise en œuvre de mécanismes moléculaires différents impliqués dans la synthèse de furocoumarines chez les agrumes et chez les Apiacées.

Sur les 7 gènes candidats, deux ont déjà été étudiés dans le cadre du projet de thèse d'Audray Dugrand-Judek. Il s'agit des séquences Ciclev10018132 et orange1.1g048790m. Je n'ai donc pas travaillé avec ces séquences. Les 5 séquences restantes ont été nommées de Cit13 à Cit16 et ont été identifiées soit chez *C. clementina*, soit chez *C. sinensis*.

### 2.3. Recherche d'autres gènes candidats par un criblage transcriptomique.



**Figure 44. Expression des séquences candidates.**

Analyse réalisée dans la banque de RNAseq de flavedo de *C. paradisi* à partir des fruits matures (M) et immatures (IM) fournis par Ryosuke Munakata. Les ordonnées sont exprimées en FPKM (Fragments Per Kilobase Million), en dessous de 100, la séquence est considérée comme « présente » ou « absente », mais elle n'est pas quantifiable.

L'analyse de la banque RNAseq de Munakata a montré que *Cit14* était plus exprimé dans les tissus immatures ce qui est cohérent avec la production de furocoumarines et est comparable au profil d'expression de *CYP82D64*.

| Code  | Nom de la séquence nucléotidique sur |                              | Source                  |
|-------|--------------------------------------|------------------------------|-------------------------|
|       | Phytosome                            |                              |                         |
|       | <i>Citrus clementina</i>             | <i>Citrus sinensis</i>       |                         |
| Cit13 | Ciclev10019648m                      | -                            | BLAST                   |
| Cit14 | Ciclev10019699m                      | -                            | BLAST                   |
| Cit15 | -                                    | orange1.1g046534m            | BLAST                   |
| Cit16 | Ciclev10019903m                      | -                            | BLAST                   |
| Cit17 | Ciclev10023490m                      | -                            | BLAST                   |
| Cit18 | Ciclev10004717m                      | orange1.1g041507m (partiale) | Chen <i>et al.</i> 2014 |

**Tableau 7. Liste des séquences candidates codantes pour des enzymes P450 impliqués dans la biosynthèse des furocoumarines chez les agrumes.**

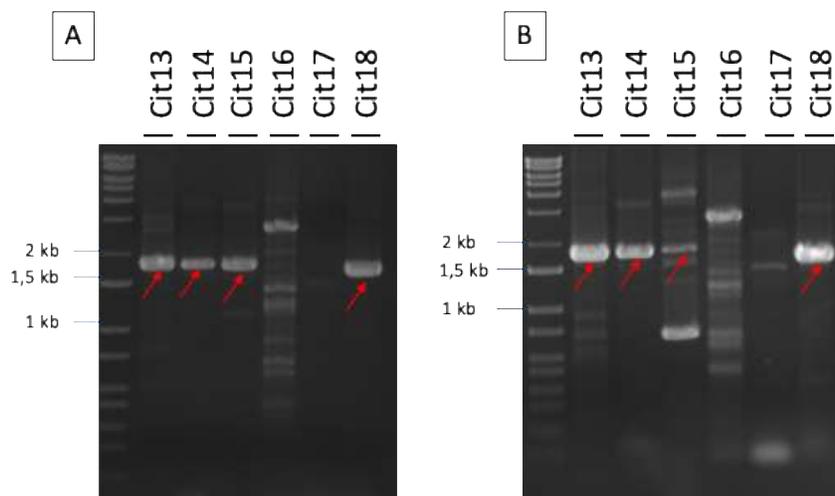
Enfin, j'ai complété cette analyse par la publication de Chen *et al.* (2014). Les travaux de ces auteurs portent sur une analyse différentielle par cDNA-AFLP entre *C. paradisi* var. Foster et une variété dérivée de la même plante ayant subi des mutations spontanées qui ont généré un phénotype produisant des fruits moins acides (*Low Acid Foster* ou LAF). L'analyse

phytochimique de ces plantes montre que le mutant LAF produit très peu de furocoumarines en comparaison de la variété Foster originelle. Ces auteurs identifient le gène Ciclev10004717m comme étant un homologue de la psoralène synthase (CYP71A11) qui est surexprimé dans le pomelo Foster, mais pas dans le LAF. Une analyse plus fine indique une homologie peptidique inférieure à 40 % avec les CYP71, il n'appartient donc pas à cette famille.

L'analyse des données génomiques et transcriptomiques m'a permis d'identifier 6 nouvelles séquences candidates (Tableau 7) potentiellement impliquées dans la production de furocoumarines ou de coumarines.

#### 2.4. Clonage des séquences codantes

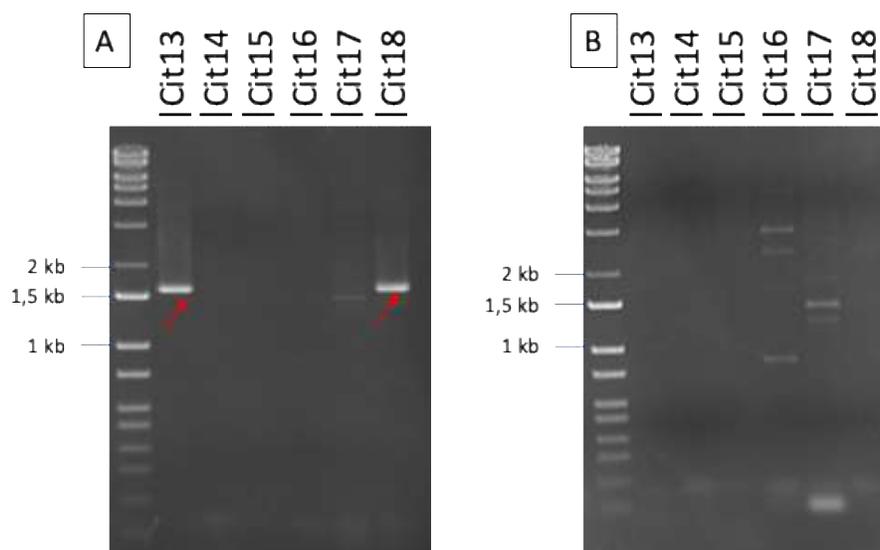
Pour vérifier la pertinence et la spécificité des amorces, j'ai réalisé une amplification par PCR des différentes séquences codantes sur de l'ADN génomique de pomelo et de mandarine (Figure 45). Pour Cit13, 14, et 18, le produit de PCR correspond à la taille attendue (Séquence codante plus intron) pour les 2 génotypes. Pour Cit15, l'amplification est spécifique pour le pomelo, tandis que pour l'orange cette amplification est très aspécifique. Ce résultat semble refléter qu'entre les 2 génotypes, ce gène a subi des modifications. Il s'agit là d'une indication intéressante dans la mesure où seul le pomelo produit des furocoumarines. Enfin pour Cit16 et Cit17, l'amplification n'a pas été efficace mettant en évidence une différence significative entre les séquences identifiées dans les bases de données et celles des 2 génomes de références.



**Figure 45. Vérification des amorces sur l'ADN génomique.**

Amplification des séquences candidates sur l'ADNg de *C. paridisi* var. Star Ruby (A) et *C. reticulata* (B). Les flèches rouges indiquent les bandes correspondant à la séquence candidate indiqué en haut de l'image.

Pour cloner les séquences codantes, j'ai réalisé une amplification à partir de l'ADNc de pomelo Star Ruby déjà utilisé pour le clonage des candidats CYP82. Les résultats obtenus n'ont permis d'amplifier que les séquences codantes correspondant à *Cit13* et à *Cit18* (Figure 16). L'absence d'amplification des autres gènes est un indicateur de leur niveau d'expression qui est visiblement trop faible dans les tissus que j'ai utilisés.



**Figure 46 Expression transcriptomique des séquences candidates de la famille CYP71.** Amplification des séquences candidates à partir du cDNA de *C. paradisi* var. Star Ruby, producteur de furocoumarines (A) ; et *C. reticulata* non producteur de furocoumarines (B). Les flèches rouges indiquent les bandes correspondant à la séquence candidate indiquée en haut de l'image.

#### 2.4.1. Annotation des séquences clonées

Après clonage et confirmation des séquences nucléotidiques par séquençages, Cit13 et Cit18 ont été envoyées au comité de nomenclature des P450 (Tableau 8). Cit13 a été identifié comme CYP71AN28 et Cit18 comme CYP706J12, qui appartient aussi au clan des CYP71. CYP706J12 présente 100 % d'identité avec la séquence candidate génomique de *C. sinensis* et 99 % d'identité avec celle de *C. clementina*.

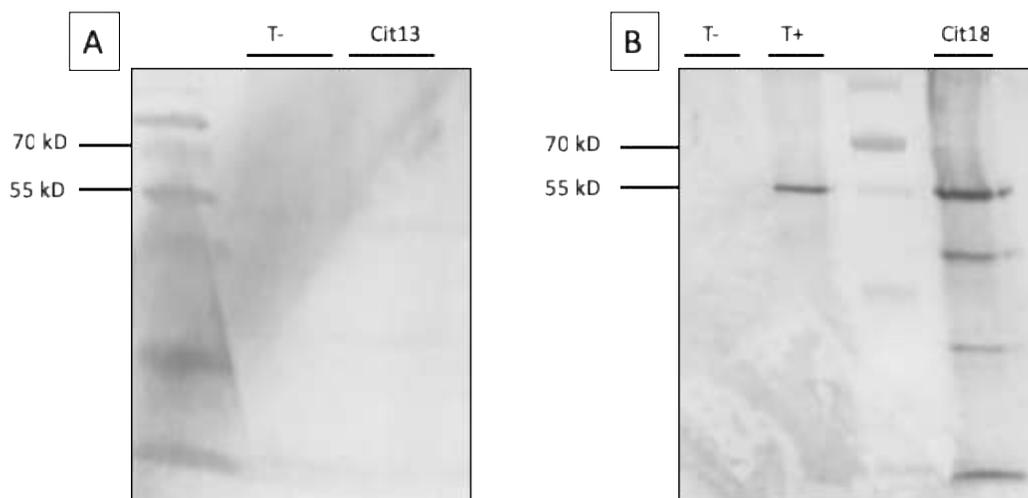
| Séquence candidate | Annotation | À partir de l'espèce   | CDS cloné vs séquence candidate (Identité) |
|--------------------|------------|------------------------|--|
| Cit13              | CYP71AN28  | <i>Citrus paradisi</i> | 100 %                                      |
| Cit18              | CYP706J12  | <i>Citrus paradisi</i> | 99-100 %                                   |

**Tableau 8. Séquences codantes candidates clonées correctement dans la levure.**

La première et deuxième colonne indiquent les séquences candidates retrouvées sur Phytozome et leur annotation assignée par le comité de nomenclature. La troisième colonne montre l'espèce à partir de laquelle la séquence codante a été clonée et finalement la dernière colonne montre l'identité entre la séquence retrouvée dans les banques des données et sur la séquence clonée.

## 2.5. Expression de CYP71AN28 (Cit13) et CYP706J12 (Cit18) et criblages métaboliques

La première étape a consisté à produire les protéines dans les levures en utilisant l'approche déjà décrite précédemment. L'analyse par immunodétection n'a pas permis de mettre en évidence la production du CYP71AN28 (Cit13) (Figure 47A), en revanche CYP706J12 (Cit18) semblait être correctement exprimé (Figure 47B).



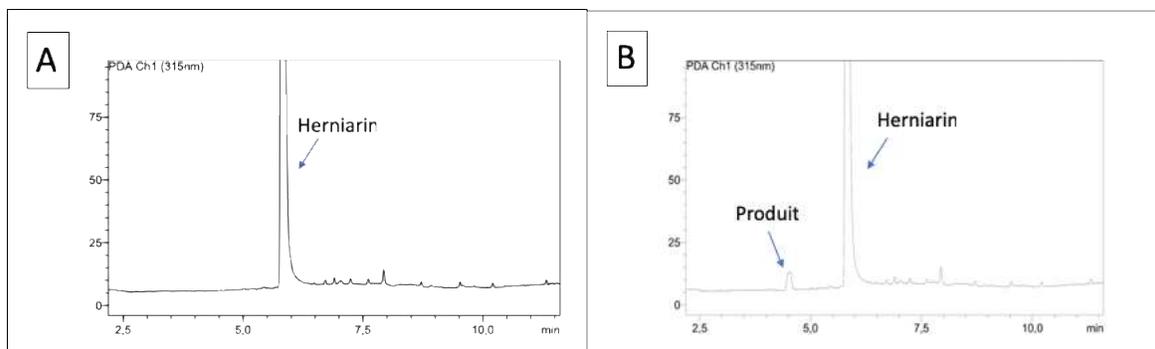
**Figure 47. Western blot réalisé sur des microsomes de levures transformés avec CYP71AN28 et CYP706J12.**

Levures WAT11 transformées avec pYeDP60-CYP71AN28 (A) et avec pYeDP60-CYP706J12.

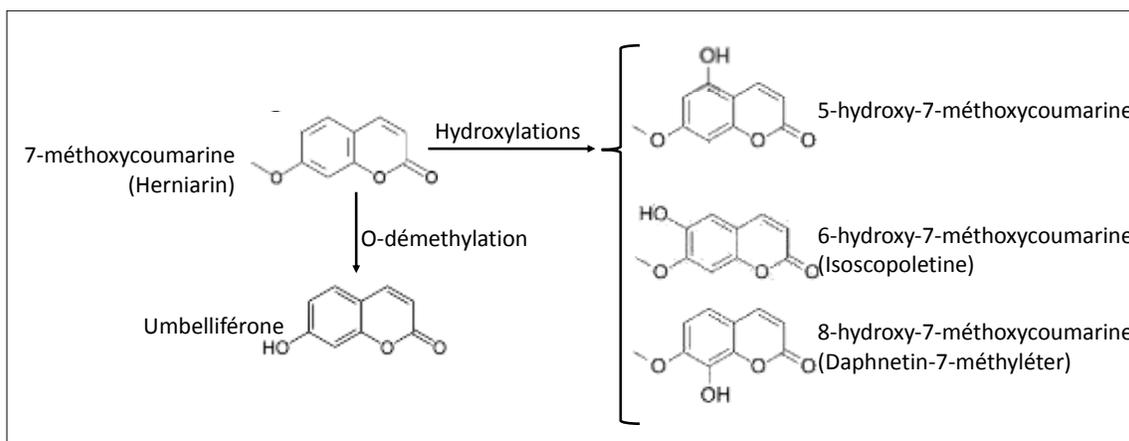
L'immunodétection a été réalisée avec des anticorps de lapin Anti-HIS, spécifiques à la queue d'histidines ajoutées à l'extrémité C-terminale des protéines. Les P450 ont une taille prédite de 50kDa.

Le témoin négatif (T-) et positif (T+) correspondent aux levures transformées avec le plasmide pYeDP60 vide et le pYeDP60-CYP71AZ4, respectivement.

Un criblage métabolique réalisé avec la totalité des substrats décrits dans la figure 42 révèle que Cit18 (CYP706J12) est en mesure de métaboliser l'herniarine (i.e. la 7-méthoxycoumarine) de manière relativement peu efficace (Figure 48B). Le produit de métabolisation est détecté en très faible quantité et n'a pu être identifié sur la base de son spectre UV. Cependant son temps de rétention plus court que l'herniarine indique que le produit de la réaction est plus polaire ce qui est cohérent avec une hydroxylation. Par comparaison avec des molécules standards disponibles au laboratoire, il est possible que la molécule produite ( $t_r = 4,5$  min) corresponde à la daphnétine-7-méthyléther ( $t_r = 4,7$ ) ou à l'isoscopoletine ( $t_r = 4,4$  min) et non à la 5-hydroxy-7-méthoxycoumarine ( $t_r = 5,5$ ). Cette hypothèse devra cependant être confirmée par une analyse plus fine en masse de la molécule (d'autres type de réactions sont possible, cf. Figure 49) voire en MS/MS pour connaître avec certitude le site d'hydroxylation.



**Figure 48. Métabolisation de l'herniarine par des microsomes de levure exprimant le CYP706.**  
Réaction sans NADPH (A) et avec NADPH (B). Chromatogramme HPLC-UV.



**Figure 49. Possibles métabolismes de CYP706A12.**  
Il est possible que l'herniarine soit hydroxylée en position 5, 6 et 8 ou o-déméthylée.

**En résumé :** Dans cette partie j'ai réalisé le clonage et l'expression de deux nouveaux P450 appartenant au clan CYP71. Le criblage métabolique réalisé avec CYP706J12 a permis de mettre en évidence la métabolisation d'une coumarine, l'herniarine, par une nouvelle famille de P450 non encore envisagée jusque-là.

### 2.5.1. Criblage fonctionnel par bioconversion

Les cytochromes P450 sont des hémoprotéines généralement considérées comme peu stables et faiblement exprimées. Le protocole de préparation de microsomes pourrait être partiellement responsable de la dégradation des enzymes. Il est possible par exemple que l'atome de fer présent dans la protoporphyrine ne soit plus positionné correctement. Dans ce cas, même si la protéine est mise en évidence par immunodétection, elle ne sera pas fonctionnelle. Pour éviter de passer par cette étape de préparation d'extraits membranaires une solution peut consister à mettre en place un procédé de bioconversion de molécules *in vivo*. Une telle approche a été mise en œuvre notamment dans les travaux de Larbat *et al.* (2007) pour caractériser CYP71AJ1 en additionnant 1 mM de marmésine au

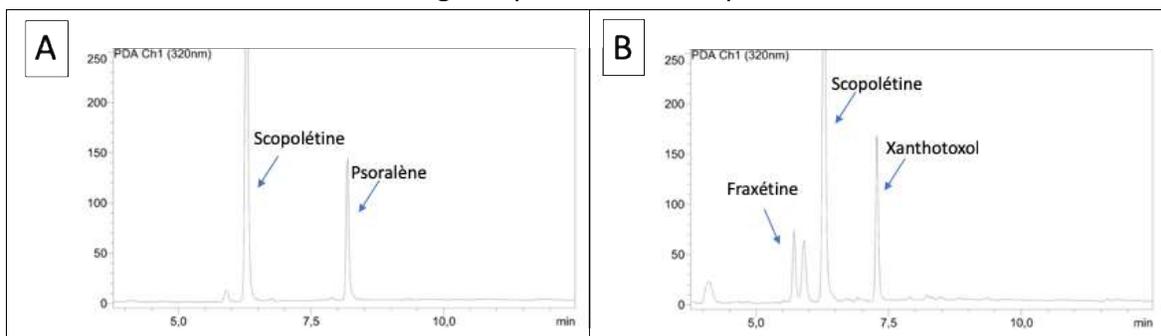
milieu de culture. La métabolisation a été mise en évidence après 4 h heures d'incubation à 24 °C.

### 2.5.1.1. Amélioration de la méthode décrite par Larbat *et al* et preuve de concept avec CYP71AZ4.

Devant l'absence de métabolisation des différents P450 étudiés, j'ai choisi d'adapter la méthode décrite par Larbat pour faire un criblage fonctionnel multi-molécules. Pour faire la preuve de concept de cette approche, j'ai utilisé CYP71AZ4, l'enzyme qui a été décrite comme étant capable d'hydroxyler le psoralène, la 6-méthoxycoumarine, 7-méthoxycoumarine et la scopolétine (Krieger et al., 2018). Après 24 h de culture dans 50 ml de milieu sélectif les levures sont centrifugées à 7 500 *g* pendant 10 min et resuspendues dans 6 mL de milieu d'induction (YPL). Cette suspension de levure est utilisée pour réaliser une incubation en présence de différents mélanges de molécules à raison de 1 mL de suspension de levure pour 10 µl de substrats à 10 mM chacun. Nous avons ainsi testé 15 molécules différentes réparties dans 5 mélanges.

- Mélange 1 : marmésine, 6-méthoxycoumarine, bergaptol et scoparone
- Mélange 2 : isoscopolétine, limettine et bergaptène
- Mélange 3 : 7-méthoxycoumarine, esculétine et xanthotoxine
- Mélange 4 : umbelliférone, xanthotoxol et fraxétine

#### Mélange 5 : psoralène et scopolétine



**Figure 50. Preuve de concept de la bioconversion des mélanges réactionnels.**

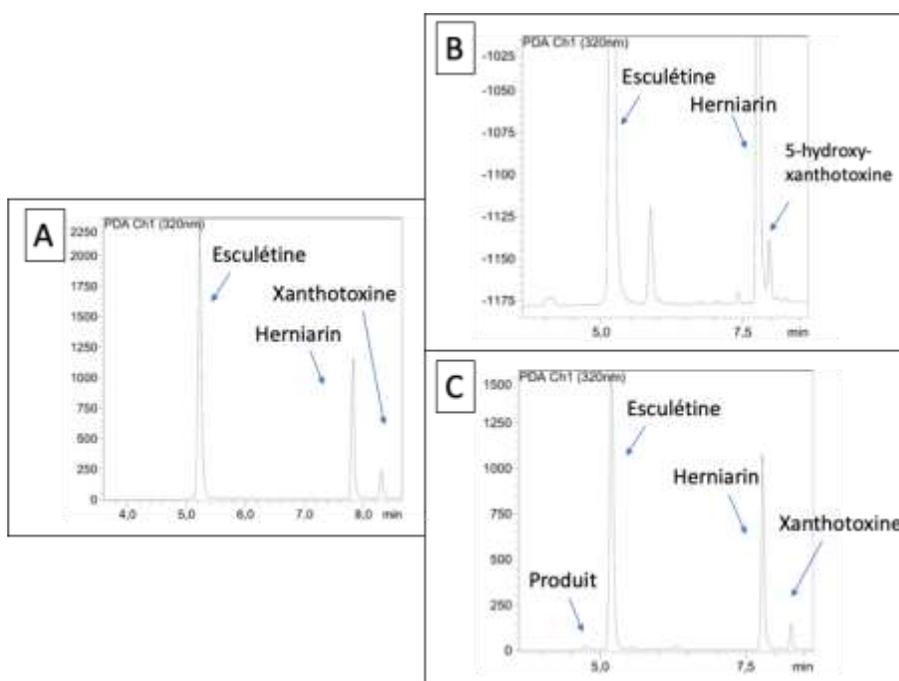
Chromatogrammes UPLC-UV (A) du témoin négatif, levures transformées avec le vecteur pYeDP60 vide ; (B) des levures transformées avec le vecteur pYeDP60-CYP71AZ4, où le psoralène est complètement converti en Xanthotoxol et la scopolétine partialement en fraxétine.

Pour pouvoir réaliser une analyse efficace du mix réactionnel, il est important qu'un mélange ne contienne pas de molécules dont la masse du produit potentiellement obtenu correspond à une masse de l'un des substrats. Par exemple, il n'est pas possible de mélanger du psoralène (186 g / mol) et du xanthotoxol (202 g / mol). Les incubations ont été réalisées sous agitation orbitale dans des plaques contenant 24 puits (le diamètre des puits

permettant un mouvement des cellules et évitant leur sédimentation). Cette incubation a été réalisée à 28 °C. Après 48 h d'incubation, le milieu de culture est récupéré, les molécules extraites par de l'acétate d'éthyle et analysées par HPLC. Les résultats obtenus indiquent la présence de xanthotoxol et de fraxétine dans le mélange 5 (Figure 50) en présence de CYP71AZ4. De manière très intéressante j'ai pu constater que dans ces conditions, le psoralène était totalement converti en xanthotoxol ce qui n'est pas le cas *in vitro* (Figure 42). Ces résultats montrent que les substrats présents dans le milieu de culture sont en mesure d'entrer dans les cellules et que les produits de réaction peuvent en ressortir puisque l'analyse n'a été réalisée que sur le milieu de culture. Enfin, cette preuve de concept montre qu'il est possible de mélanger des molécules et que, dans ce cas, il n'y a pas d'effet inhibiteur des autres molécules.

### 2.5.1.2. Test de tous les P450s candidats de la famille CYP82, CYP71AN28 et CYP706J12.

Cette approche a été utilisée pour réaliser un criblage fonctionnel de l'ensemble des P450 candidats identifiés dans le cadre de ce travail de thèse, y compris les protéines pour lesquelles je n'ai pas pu mettre en évidence d'expression par l'approche d'immunodétection dans les microsomes.



**Figure 51. Bioconversion dans le mélange réactionnel 3.**

Chromatogrammes UPLC-UV (A) du témoin négatif, levures transformées avec le vecteur pYeDP60 vide ; (B) des levures transformées avec le vecteur pYeDP60-CYP82D64, où la xanthotoxine est complètement converti en 5-hydroxy-xanthotoxine et possiblement l'herniarine en 5-hydroxy-7-méthoxycoumarine ; et (C) des levures transformées avec le vecteur pYeDP60-CYP706J12, où il y a un nouveau produit comme dans la Figure 48B.

Les résultats obtenus confirment la transformation de xanthotoxine en 5-hydroxy-xanthotoxine et possiblement d'herniarine en 5-hydroxy-7méthoxycoumarine dans le mélange réactionnel 3 par CYP82D64 comme cela a été décrit précédemment par Dugrand Judek (Figure 51B). Ils confirment également la métabolisation de l'herniarine par CYP706J12 (Figure 51C). Malheureusement, aucune autre activité n'a pu être mise en évidence ce qui semble indiquer que les molécules testées jusque-là ne sont pas les bons substrats des enzymes candidates.

### **3. Discussion et perspectives**

#### **3.1. Évolution convergente des CYP71 et CYP82**

*Apiaceae* et *Rutaceae* appartiennent à des espèces végétales assez éloignées d'un point de vue évolutif. Pourtant, ils ont tous les deux développé des voies de biosynthèse capables de synthétiser indépendamment des furocoumarines (Bourgaud *et al.* 2014). Une analyse phytochimique montre que les furocoumarines produites ne sont cependant pas les mêmes. Certaines *Apiaceae* produisent des furocoumarines linéaires et angulaires, tandis que les rutacées et en particulier les agrumes ne produisent que les linéaires (F. Bourgaud *et al.*, 2006; Frédéric Bourgaud *et al.*, 2014; Dugrand-Judek *et al.*, 2015). Chez les apiacées, plusieurs P450 de la famille des CYP71 ont été identifiés comme étant impliqués dans la production de furocoumarines. Les premiers résultats de caractérisation enzymatique chez les agrumes semblent indiquer que les familles de P450 impliquées dans la synthèse de ces molécules ne sont pas les même chez les 2 espèces. La réaction d'hydroxylation de la xanthotoxine est réalisée par CYP82D64 chez *C. paradisi* tandis que chez le panais cette même réaction est catalysée par CYP1AZ6 (Krieger *et al.*, 2016). Ces deux familles d'enzymes ont un ancêtre commun et appartiennent toutes deux au clan des CYP71. De manière similaire, il a été montré que CYP82D64 était capable d'hydroxyler l'herniarine pour donner la fraxétine. Cette réaction est réalisée par CYP71AZ4 chez le panais mais également par CYP82C4 chez *Arabidopsis* (Rajniak *et al.*, 2018). Sachant que cette dernière plante ne produit pas de furocoumarines, l'ensemble de ces éléments plaide en faveur d'une évolution de la voie de biosynthèse des furocoumarines à partir de coumarines.

#### **3.2. Identification d'un nouveau P450 impliqué dans la synthèse des coumarines chez les agrumes**

Les travaux décrits dans ce chapitre ont permis d'identifier une nouvelle sous famille de P450 impliquée dans la métabolisation de coumarines. Par manque de temps, je n'ai pas pu réaliser la caractérisation biochimique du produit de la réaction. Plusieurs hypothèses

sont envisageables. Les comparaisons faites avec des standards disponibles indiquent qu'il pourrait s'agir d'une hydroxylation en position C6 ou C8. Une autre piste pourrait consister en une O-déméthylation. Cette activité est moins commune pour les P450s, mais déjà décrite chez des enzymes d'artichaut : CYP73A1 (C4H) et CYP76B1, qui peuvent réaliser une O-déméthylation sur l'herniarine et une O-déthylation sur la 7-éthoxycoumarine pour produire l'umbelliférone. CYP76B1 peut aussi métaboliser d'autres molécules toxiques comme le chlortholuron et l'isoproturon, entre autres (Pierrel et al., 1994; Robineau et al., 1998). CYP76B1 est donc impliqué dans la détoxification de la plante plutôt que dans la biosynthèse des coumarines. Il est intéressant de noter que la famille CYP706 partage un ancêtre commun avec la famille CYP76. Il est donc fort probable que cette activité opportuniste de détoxification soit également réalisable par CYP706J12. Par la suite il serait intéressant de tester la 7-éthoxycoumarine et le reste des substrats que CYP76B1 accepte.

La première activité enzymatique décrite de la famille CYP706 concerne CYP706B1 chez le coton. Cette enzyme a été caractérisée comme étant une (+)-d-cadinene-8-hydroxylase impliquée dans la biosynthèse du gossypol (un sesquiterpène aldéhyde) et associé à la défense de la plante contre les herbivores (Luo, Wang, Wang, Essenberg, & Chen, 2001). Un autre CYP706, CYP706M1, a quant à lui été décrit comme une valence oxydase chez le cyprès d'Alaska (Cankar et al., 2014). Cette enzyme métabolise un sesquiterpène cétone le (+)-Nootkatone. On retrouve ce composé dans la peau des agrumes où il a un rôle important pour le goût et l'arôme du pomelo et de l'orange. De manière intéressante, d'autres valences oxydases ont été identifiées comme étant des CYP71 chez la chicorée et le tabac (Cankar et al., 2014; Gavira et al., 2013). Ce qui montre encore une fois comment deux familles différentes de plantes ont réussi à avoir des activités métaboliques similaires par évolution convergente.

Toutes mes séquences candidates clonées, ont été amplifiées à partir des ARNm. Ce qui veut dire qu'ils sont transcrits et donc probablement fonctionnels dans la plante. L'absence d'identification fonctionnelle peut avoir au minimum deux origines. Le premier pourrait être une manque de stabilité de ces enzymes réputées fragiles conduisant à leur dégradation lors de la préparation des microsomes. Ce problème peut être contourné par des approches de bioconversion qui fonctionnent correctement avec les molécules cibles testées ici. Le second aspect problématique concerne l'identification du substrat physiologique qui est directement lié à la richesse du métabolisme spécialisé chez les plantes, constitué de milliers de molécules différentes.



# **Conclusion générale et perspectives**



## Conclusion générale et perspectives

L'objectif principal de ma thèse était de développer des outils permettant de générer des pomelos ne produisant plus de furocoumarines. Pour cela il me fallait lever un grand nombre de verrous sur lesquels j'ai travaillé en parallèle (Figure 52) à différents endroits et avec différentes personnes.

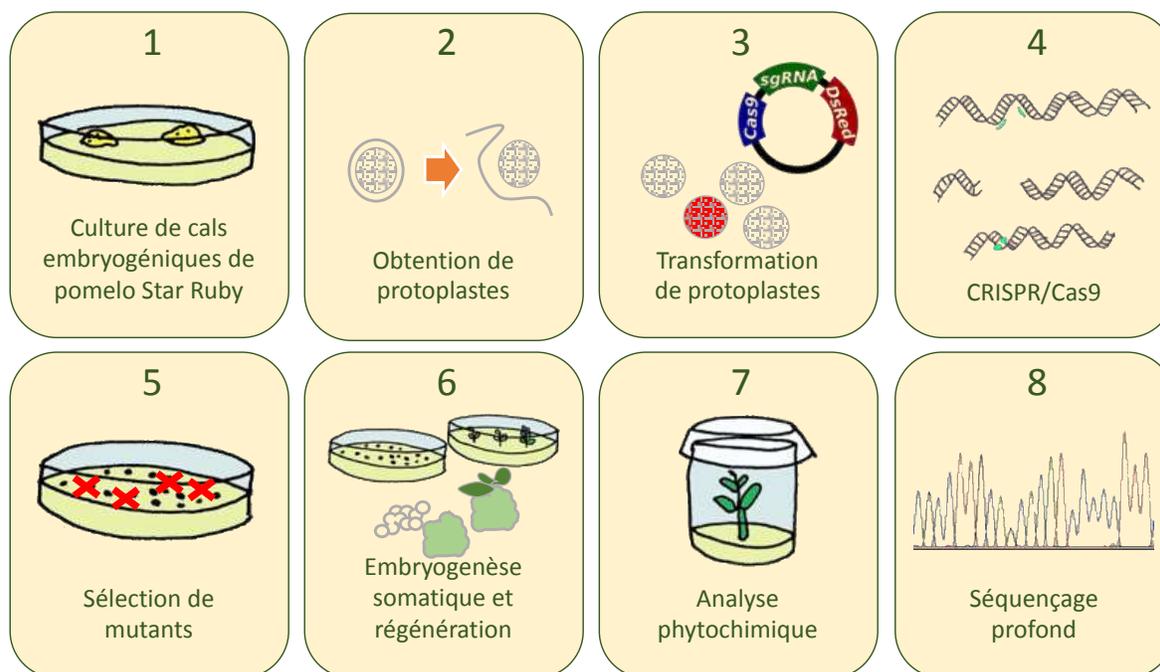


Figure 52. Récapitulatif de ce travail de thèse.

La mise au point de la production de protoplastes a été faite à partir de cals fournis par Dominique Dambier. Les protoplastes générés m'ont permis de développer une méthode de transformation par électroporation avec des constructions CRISPR/Cas9 dont certains m'ont été fournis par Fabien Nogué. Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse indiquent que l'approche mise en œuvre est viable.

A l'issue de cette thèse, il reste maintenant à lever un ultime verrou qui se situe entre la transformation des protoplastes et la culture des plantes : la régénération par induction de l'embryogenèse somatique. Ce point a été souvent décrit comme limitant dans la sélection variétale mais a été couronné de succès dans certains cas.

Une fois les plantes régénérées, l'ultime étape consistera à vérifier que l'inactivation du gène *GfPT1* entraîne réellement une inhibition de la production de furocoumarines. Si ce n'est pas le cas, il sera nécessaire d'identifier des gènes cibles complémentaires. CYP82D64 en est un. Les travaux que j'ai réalisés dans le cadre des expériences de bioconversion

confirme l'activité de cette enzyme en lien avec la synthèse de 5-hydroxy-xanthotoxine. Si je n'ai pas pu identifier d'autres CYP82 directement impliqués dans la synthèse de ces molécules, mes travaux ont permis d'identifier une nouvelle sous famille jouant un rôle dans la synthèse des coumarines, la famille CYP706. En se basant sur les résultats décrits pour la famille CYP71 chez le panais et la famille CYP82 chez les agrumes et chez *Arabidopsis*, on peut constater que les familles de gènes impliqués dans la synthèse de furocoumarines jouent également un rôle dans la synthèse de coumarines. Il sera donc intéressant de rechercher d'autres gènes de cette famille CYP706 chez les agrumes. Au-delà, une analyse phylogénétique du clan 71 permettra peut-être de dégager de nouvelles pistes pour trouver de nouveaux gènes candidats.

Un grand intérêt de ce travail de thèse réside dans le fait que les outils développés peuvent être transférés à d'autres espèces d'agrumes et/ou variétés de pomelo dont on maîtrise mieux la régénération. En effet, la recherche sur l'effet pomelo est concentré sur ce fruit, mais d'autres agrumes producteurs de furocoumarines présentent également cette interaction avec les médicaments. Il serait également possible de cibler d'autres gènes, pas seulement impliqués dans la voie de biosynthèse des furocoumarines, mais aussi des gènes pour différents projets de recherche. Cette méthode ouvre ainsi la porte à une nouvelle vision de l'amélioration génétique des agrumes. L'identification de gènes apportant par exemple une résistance à des maladies émergentes comme la maladie du dragon jaune et leur introduction dans le génome des agrumes pourrait apporter des solutions intéressantes pour cette filière.

# **Chapitre III :**

## **Matériel et Méthodes**



# Chapitre III : Matériel et Méthodes

## 1. Matériel

### 1.1. Matériel végétal

#### 1.1.1. Agrumes

Les agrumes utilisés pour cette étude ont été fournis par 1) Marc Rémy et Aurélie Mangenot du Jardin botanique Jean Marie Pelt du grand Nancy de l'Université de Lorraine et 2) et par la Station de Recherche Agronomique INRA/CIRAD de San Giuliano en Corse, au travers une collaboration établie entre le LAE et le groupe de Yann Froelicher (Unité Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes (AGAP)). Pour les plantules issues de la germination des graines et pour la préparation de microsomes de peau de pomelo « Star Ruby », les fruits ont été achetés au marché municipal de Vandœuvre-lès-Nancy.

Les cals embryogéniques de *C. paradisi* var. Star Ruby nous ont été fournis par Dominique Dambier de l'unité AGAP au CIRAD de Montpellier. Ces cals ont été obtenus à partir du tissu nucellaire des ovules. Ils sont transférés dans du milieu MT et *Half and Half* toutes les 5 semaines (voir paragraphe 5.1 de ce chapitre du manuscrit).

### 1.2. Matériel microbiologique

#### 1.2.1. *Escherichia coli*

| <i>E. coli</i> | Utilisation   |
|----------------|---|
| GeneHogs®      | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Amplification de plasmides de grande taille.</li> <li>• Clonages avec le kit pCR8™/GW/TOPO®</li> <li>• Clonages par LR recombinaison dans le plasmide pYeDP60_GW et le pEAQ-HT-DEST1.</li> </ul> |
| Top 10®        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Amplification de plasmides</li> <li>• Clonages avec le kit pCR8™/GW/TOPO®.</li> </ul>  |
| MC1022         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Amplification de plasmides de grande taille</li> <li>• Clonages avec le kit pCR8™/GW/TOPO®.</li> </ul>   |
| DH10B          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Clonages par LR recombinaison dans le plasmide pYeDP60_GW et le pEAQ-HT-DEST1.</li> </ul>  |
| ccdB Survival™ | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Amplification des plasmides contenant une cassette Gateway avec le gène <i>ccdB</i>.</li> </ul>  |

Tableau 9. Souches d'*E. coli* et leur utilisation spécifique.

Plusieurs souches d'*E. coli* sont utilisées afin d'amplifier les différents plasmides et pour le clonage de fragments d'ADN. La préparation de bactéries électrocompétentes est réalisée au LAE à partir de stocks glycérols (protocole en Annexe 8). Les souches Top 10®,

chimiocompétentes sont commerciales (Invitrogen), les autres ont été préparées par nos soins. Les différentes souches utilisées lors de ma thèse sont répertoriées dans le Tableau 9.

### **1.2.2. *Saccharomyces cerevisiae* WAT11 et WAT21**

Les souches Wat11 et Wat21 de *S. cerevisiae* ont été créées par le Dr. Pompon (Laboratoire d'Ingénierie des Protéines Membranaires (LIMP), Gif-sur-Yvette, France) pour la production hétérologue de P450s de plantes (Pompon et al., 1996). Elles dérivent de la souche W303. La séquence codante endogène de la NADPH P450 réductase a été remplacée par les séquences codantes des P450 réductases d'*A. thaliana* : *AtR1* pour WAT11 et *AtR2* pour WAT21. La transcription des séquences codant pour les ARNm *AtR1* et *AtR2* est sous le contrôle du promoteur *GAL10-CYC1*, qui est réprimé par le glucose et induit par le galactose, permettant de produire les protéines correspondantes. Les souches WAT11 et WAT21 sont mutées au niveau du gène *ADE2*, ce qui les rend auxotrophes pour l'adénine. Cette auxotrophie permet d'avoir une pression de sélection des levures par complémentarité avec un plasmide contenant le gène *ADE2* (voir paragraphe 1.3.3 de ce chapitre du manuscrit).

## **1.3. Vecteurs**

### **1.3.1. pCR8**

Le kit pCR8™/GW/TOPO® (Figure 53) est un kit commercial (Invitrogen™), utilisé pour le clonage rapide et efficace d'un produit de PCR. Le plasmide pCR8 est fourni sous forme linéarisée et possède deux extrémités 3'-thymidine (T) sortantes pour réaliser un « TA cloning ». La Topoisomérase I du virus *Vaccinia*, est liée de façon covalente au vecteur sur un site spécifique (CCCTT) permettant une ligation rapide du produit de PCR dans le vecteur linéarisé.

Le plasmide pCR8 possède l'origine de répllication du plasmide pUC, permettant son amplification dans *E. coli*, et un gène de résistance à la spectinomycine pour la sélection des colonies transformées avec le vecteur circulaire contenant l'insert. Les sites d'hybridation pour des amorces universelles (M13F et T7prom) permettent de vérifier le sens d'insertion du gène d'intérêt dans le plasmide et de réaliser le séquençage du fragment inséré. Les sites *attL1* et *attL2* issus du bactériophage  $\lambda$  permettent une recombinaison rapide grâce à l'enzyme LR clonase II (Invitrogen) vers un vecteur de destination de type Gateway (voir paragraphe 2.9 de ce chapitre du manuscrit). Enfin, la cassette de clonage du vecteur est également flanquée de deux sites de restriction *EcoR1*, permettant la vérification rapide de la présence de l'insert par digestion enzymatique.

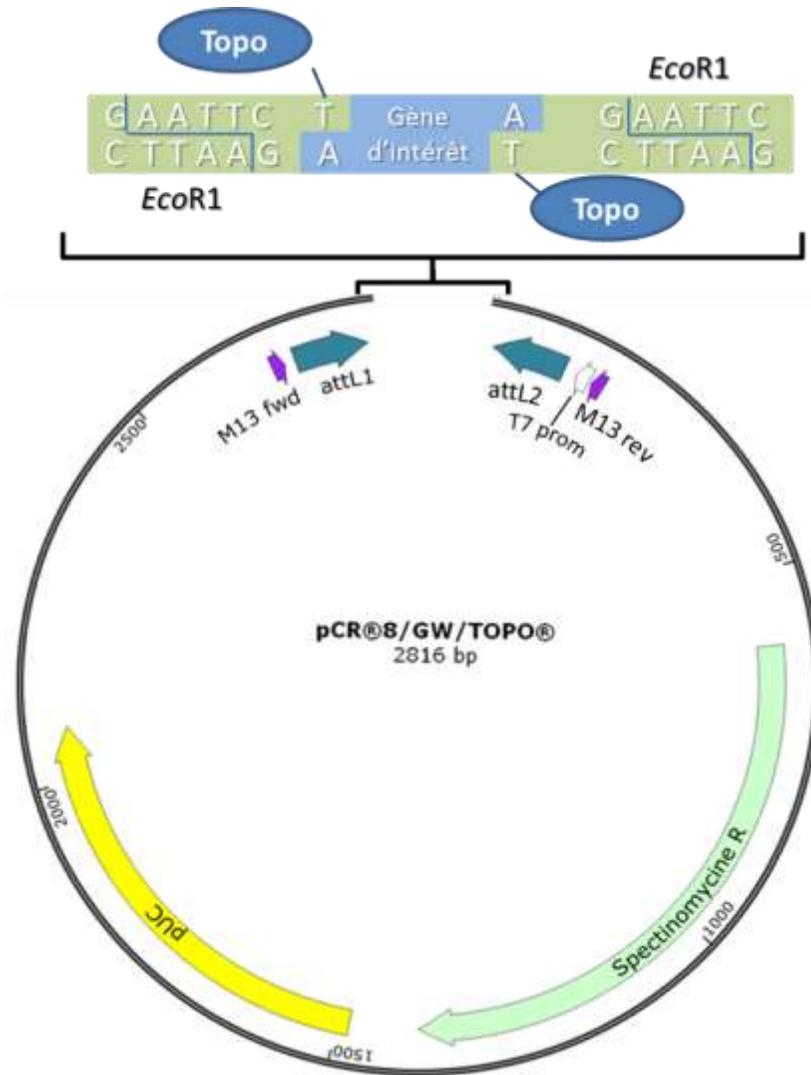


Figure 53. Carte du vecteur de clonage pCR8™/GW/TOPO®.

### 1.3.2. pDONR™207

Le plasmide pDONR™207 (Life Technologies) est un vecteur adapté à la technologie Gateway® (Figure 54). Il contient les sites *attP1* et *attP2* permettant de réaliser la recombinaison homologue avec une séquence flanquée par les séquences *attB1* et *attB2* (voir paragraphe 2.9 de ce chapitre du manuscrit). Le plasmide natif contient un gène de résistance au chloramphénicol et la séquence codante *ccdB* entre les sites *attP1* et *attP2*. Il contient également un gène de résistance à la gentamicine hors du site de recombinaison. L'amplification de ce plasmide est réalisée par la transformation de bactéries *E. coli ccdB survival*™.

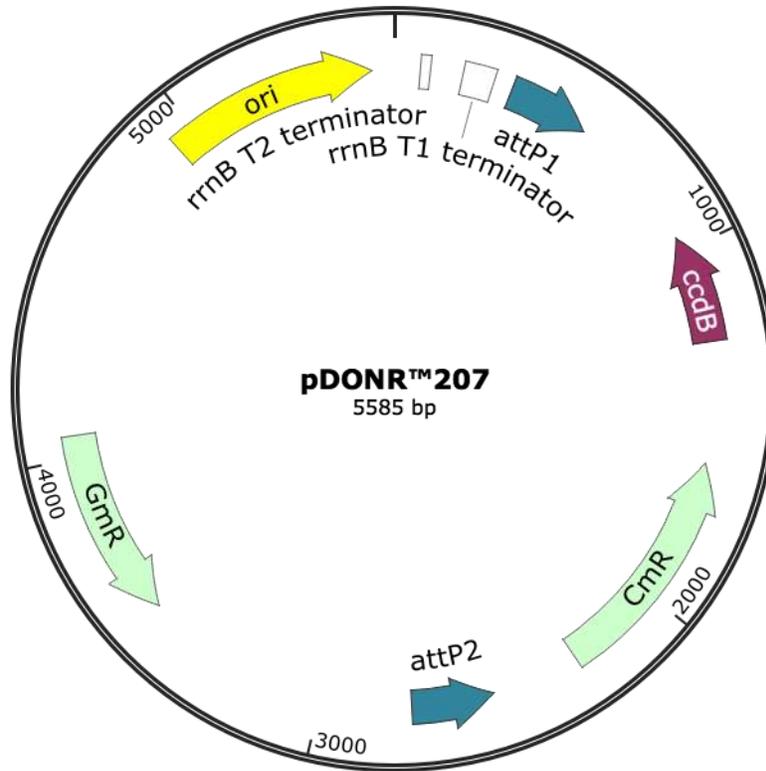


Figure 54. Carte du vecteur de clonage pDONR™207.

### 1.3.3. pYeDP60\_GW

Le vecteur pYeDP60\_GW® (Figure 55) dérive directement du vecteur pYeDP60 qui a été fourni par le Docteur Denis Pompon du LIMP. Il a été spécialement conçu pour l'expression de P450 dans les souches WAT11 et WAT21 (voir paragraphe 1.2.2 de ce chapitre du manuscrit). Ce vecteur navette est doté d'une origine de répllication pour les bactéries et d'une origine de répllication 2 $\mu$  de levure. L'ajout de la cassette Gateway® au vecteur pYeDP60 a été réalisé par le Dr Célia Krieger au cours de sa thèse au laboratoire LAE (Krieger 2014). Pour cela, elle a inséré la cassette de recombinaison RfA (flanquée des sites *attR* et contenant les séquences codantes de *ccdB* et de résistance au chloramphénicol) au niveau du site de restriction *Bam*HI ; en amont du promoteur *GAL10-CYC1* et en aval par le terminateur PGK. Le gène *ADE2* permet de pallier l'auxotrophie à l'adénine des levures WAT11 et WAT21. En conséquence, seules les levures transformées par pYeDP60\_GW® pourront se développer dans un milieu dépourvu d'adénine, une fois le gène d'intérêt inséré dans pYeDP60\_GW®. L'amplification de ce plasmide avant recombinaison est réalisée par la transformation de bactéries *E. coli ccdB survival*™. Ce vecteur possède aussi un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection de bactéries transformées avec le vecteur contenant le gène d'intérêt après la LR recombinaison.

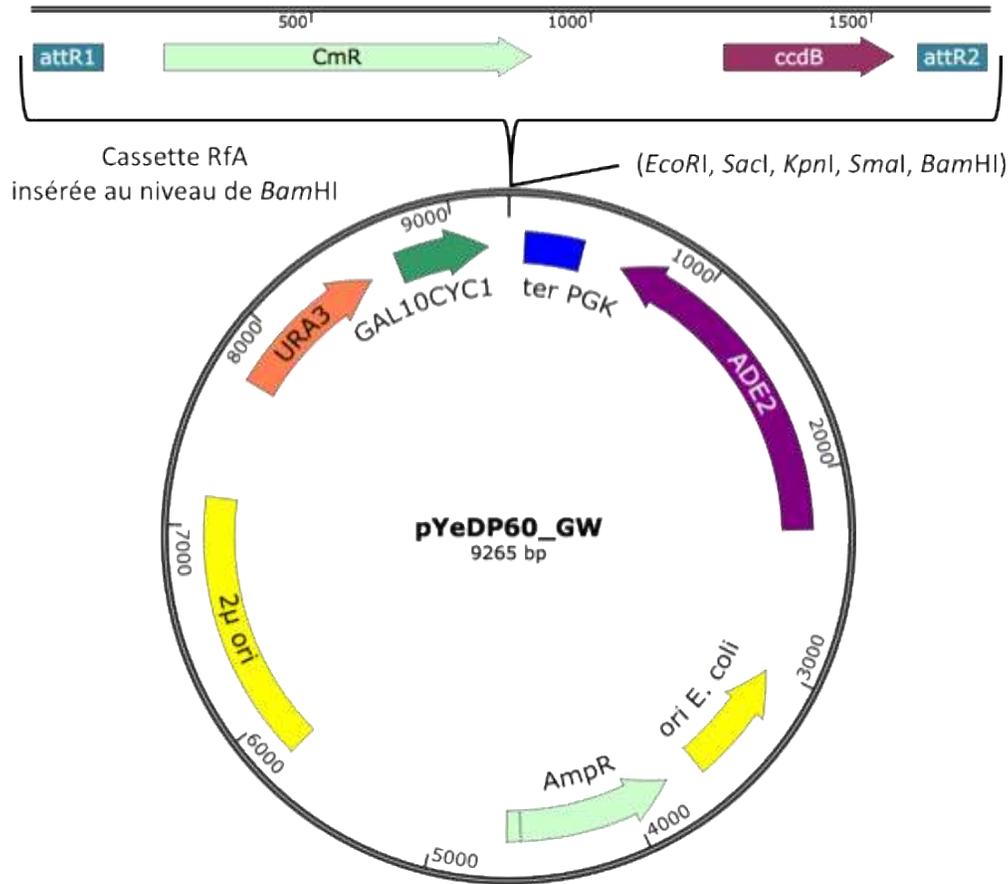


Figure 55. Carte du vecteur d'expression pYeDP60\_GW®.

| Amorce | Séquence                     |
|--------|------------------------------|
| Ye Bam | 5' TCTTTCCTTATACATTAGGTCC 3' |
| Ye Eco | 5' CAACACCTGGCAATTCCTTACC 3' |

Tableau 10. Amorces de séquençage du pYeDP60\_GW® en amont et en aval du gène inséré.

#### 1.3.4. pBIN m-gfp5-ER

Le plasmide pBIN *m-gfp5-ER* a été fourni par le Pr. Jim Haselhoff (Division of Cell Biology, MRC Laboratory of Molecular Biology, Addenbrookes Hospital, Hills Road, Cambridge, CB2 2QH, United Kingdom). Il s'agit d'un vecteur à faible nombre de copies et il possède un gène de résistance à la kanamycine pour la sélection des bactéries transformées. Ce vecteur porte aussi une séquence nucléotidique codant pour une protéine fluorescente verte (GFP) modifiée qui a été adaptée pour son expression dans les plantes.

#### 1.3.5. pBNRF

Le vecteur (Figure 56) nous a été fourni par le Dr. Fabien Nogué, et a été construit dans son laboratoire (Schaefer et al., 2010). Il y a inséré une cassette contenant le gène

*neoR* de résistance à la néomycine/kanamicyne sous le contrôle d'un promoteur 35S entre les deux sites *LoxP* du plasmide pMCS5 (MoBiTec). Ce vecteur est utilisé dans le développement d'une technique de sélection transitoire de protoplastes transformés de pomelo.

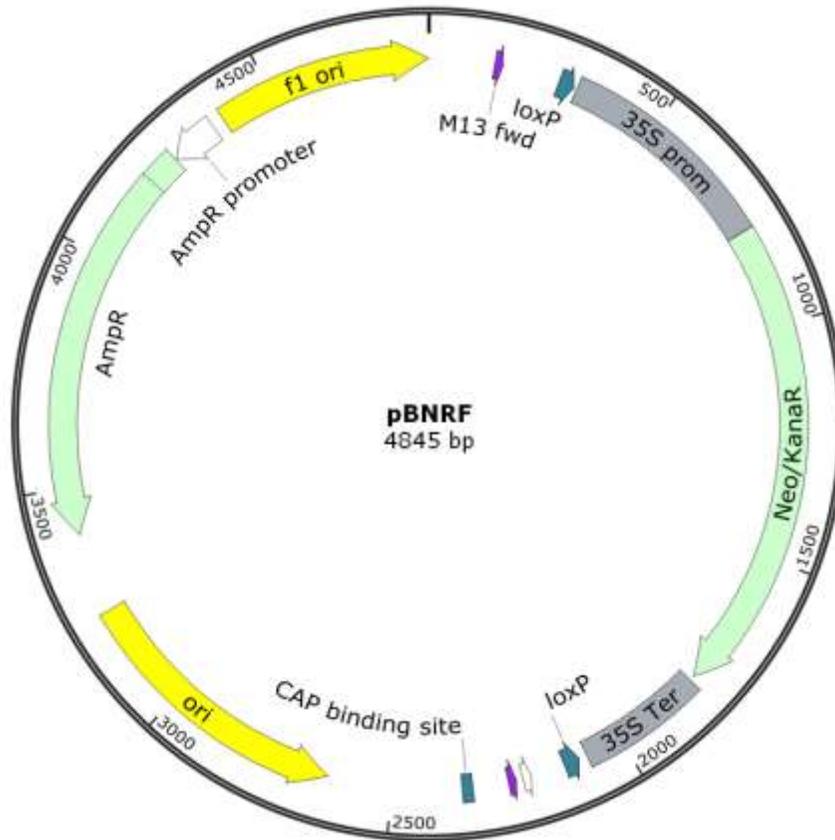


Figure 56. Carte du vecteur pBNRF fourni par le Dr. Fabien Nogué.

### 1.3.6. pDe-Cas9-DsRed

Le vecteur pDe-Cas9-DsRed (Figure 57) a été construit par Morineau *et al.* (2017) en échangeant la cassette Basta de résistance au glufosinate du vecteur pDe-Cas9 (Fauser, Schiml, & Puchta, 2014) par la cassette DsRed, qui contient la séquence codante de la protéine fluorescente DsRed2 placée sous le contrôle du promoteur constitutif CsVMV. Ce vecteur contient également la séquence nucléotidique codant pour la protéine Cas9 de *S. pyogenes* dont les codons ont été optimisés pour *A. thaliana* sous le contrôle du promoteur ubiquitine de persil PcUbi4-2. Grâce aux sites de recombinaison *attR1* et *attR2*, il est possible d'insérer les constructions du sgRNA permettant de cibler les séquences cibles de l'ADN génomique. Ainsi, ce vecteur permet de réaliser l'édition d'un génome en réunissant tous les éléments utiles à CRISPR/Cas9. Ce vecteur nous a été fourni par le Dr. Fabien Nogué.

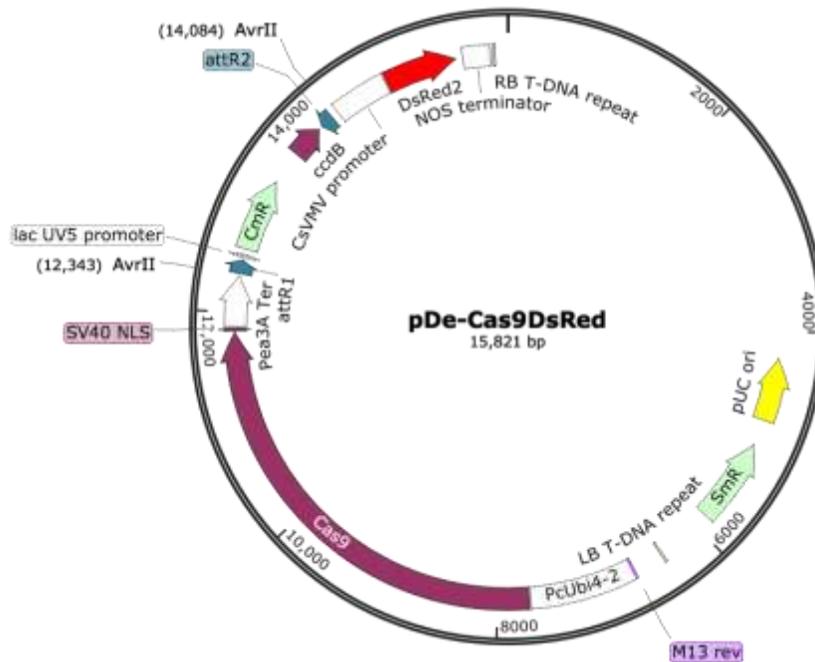


Figure 57. Carte du vecteur pDE-Cas9-DsRed fourni par le Dr. Fabien Nogué.

### 1.3.7. pCAS9-DsRed

Le plasmide pCas9-DsRed dérive directement du pDE-Cas9-DsRed, dont la cassette Gateway® a été enlevée par une digestion *Avr2*. Il ne produit donc que la Cas9 et la DsRed2. Ce vecteur a été également fourni par le Dr. Fabien Nogué.

## 1.4. Milieux de culture

### 1.4.1. Milieux de culture pour bactéries

#### 1.4.1.1. LB

Le milieu LB (Luria-Bertani) est utilisé pour la croissance de toutes les souches de bactéries *E. coli* utilisés au LAE. Le milieu liquide est préparé en dissolvant 25 g de poudre LB (Sigma Aldrich, L3152) dans un litre d'eau distillée. La solution est ensuite autoclavée (20 min, 1 bar, 121 °C). Pour la préparation du milieu solide il faut ajouter 16 g d'agar par litre de LB à cette solution préparée avant autoclavage. Le milieu LB liquide autoclavé est ensuite stocké à température ambiante, tandis que le milieu LB avec l'agar-agar est refroidi à 50 °C avant d'être supplémenté par des antibiotiques *ad'hoc* et d'être transféré dans les boîtes de Pétri. Ces boîtes sont conservées à 4 °C.

#### 1.4.2. Antibiotiques

Afin de sélectionner une souche de bactérie particulière (transformée ou non transformée), un ou plusieurs antibiotiques sont additionnés au milieu de culture après

autoclavage. Tous les antibiotiques sont utilisés à une concentration finale de 100 µg/mL solubilisés dans l'eau, sauf la rifampicine (20 µg/mL dans du DMSO) le chloramphénicol (33 µg/mL dans de l'éthanol 100 %) et la kanamycine (50 µg/mL dans l'eau). Finalement ils sont tous filtrés à 0,22 µm.

### **1.4.3. Milieux de culture levures**

#### **1.4.3.1. YPGA**

Le milieu YPGA est un milieu de culture complet contenant de l'adénine, ce qui permet la croissance des souches de levures *S. cerevisiae* WAT11 et WAT21 non transformées. Ce milieu est un mélange de : 10 g de Bacto™Peptone (BD 211677) et 10 g d'extrait de levure (Laboratorios Conda S.A.) dans 880 mL d'eau distillée. Après stérilisation (20 min, 1 bar, 121 °C), 100 mL de glucose à 200 g/L (autoclavé) et 20 mL d'adénine à 10 mg/mL filtré à 0.22 µm) sont ajoutés. L'adénine est préparée dans une solution HCl 0,5 M et stockée à température ambiante. Pour le milieu YPGA solide sont ajoutés 20 g/L d'agar avant autoclavage.

#### **1.4.3.2. SGI**

Le milieu SGI est un milieu minimum sélectif dépourvu d'adénine qui permet de sélectionner les levures transformées par les plasmides dérivés de pYeDP60\_GW. Ce milieu est un mélange de : 1 g de Bacto™ *Casamino Acids* (BD 223050) et 7 g de *Yeast nitrogen base* sans acides aminés (Sigma, Y0626) dans 998 mL d'eau distillée. Après stérilisation (20 min, 1 bar, 121 °C), 100 mL de glucose à 200 g/L (autoclavé) et 2 mL de tryptophane à 10 mg/mL (filtré à 0,22 µm) sont ajoutés. Le tryptophane est préparé dans une solution HCl 0,5 M et stocké à 4 °C. Pour le milieu solide sont ajoutés 20 g/L d'agar avant stérilisation.

#### **1.4.3.3. YPGE**

Le milieu YPGE est un milieu complet qui permet le développement de biomasse de levure. Dans un premier temps, les levures utilisent le glucose comme source de carbone, puis lorsqu'il n'est plus disponible, elles utilisent l'éthanol. Ce milieu est un mélange de : 10 g de Bacto™Peptone et 10 g d'extrait de levure dans 945 mL d'eau distillée. Après stérilisation (20 min, 1 bar, 121 °C), sont ajoutés 25 mL de glucose à 200 g/L (autoclavé) et 30 mL d'éthanol absolu.

#### **1.4.3.4. YPL**

Le milieu YPL est un milieu d'induction par le galactose. Ce milieu est un mélange de : 10 g de Bacto™Peptone et 10 g d'extrait de levure dans 900 mL d'eau distillée. Après

stérilisation (20 min, 1 bar, 121 °C), sont ajoutés 100 mL de galactose à 200 g/L (autoclavé) et 30 mL d'éthanol absolu.

#### **1.4.4. Milieux de culture *in vitro* d'agrumes**

##### **1.4.4.1. Solutions stocks**

La composition des solutions stocks utilisées pour préparer les milieux de culture *in vitro* d'agrumes est décrite dans l'Annexe 9. Les solutions pour la culture *in vitro*, hors culture de protoplastes, sont préparées avec de l'eau déminéralisée stérile. Les différentes solutions stocks et milieux liquides pour la culture des protoplastes sont préparés avec de l'eau ultrapure stérile *et* aliquotés dans des tubes de 50 mL pour être congelés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

##### **1.4.4.2. Milieu MS**

Le milieu basal MS (Murashige & Skoog, 1962) est le milieu le plus utilisé pour la culture *in vitro* de plantes. Pour induire la germination des graines de pomelo, il a été utilisé en ajoutant 0,5 mg/L de 6-benzylaminopurine (BAP). Pour 1L de ce milieu liquide on ajoute 4,3 g de milieu MS en poudre (Duchefa M0221), 3g de saccharose et, après stérilisation (20 min, 1 bar, 121 °C), 10 mL d'une solution 100X de vitamines MS (Duchefa M0409) filtrée à 0,22 µm. Le pH est ajusté à 5,8 avec KOH 1N. Pour la préparation de milieu MS solide, on ajoute 7,5 g d'agar HP696 (Kalys-Biotech A7921) avant autoclavage.

##### **1.4.4.3. Milieu MS/2**

Cette variation du milieu MS est utilisée pour le repiquage des plantes de pomelo *in vitro*. Ce milieu est préparé comme décrit dans le paragraphe précédent avec des quantités de poudre MS et de Vitamines divisées de moitié. La concentration du saccharose est augmentée à 20 g/L. Le pH est ajusté à 5,8 avec KOH 1N. Pour la préparation de milieu MS/2 solide, 7,5 g d'agar sont ajoutés avant autoclavage.

##### **1.4.4.4. Milieu MT**

Le milieu MT est une variante du milieu MS qui a été développée par Murashige et Tucker (Murashige & Tucker, 1969) pour la propagation des espèces d'agrumes. 4,3 g du milieu MS en poudre, 10 mL de vitamines de Tucker 100X (Annexe 9) et 0,5 g d'extrait de malte sont mélangés pour constituer 1L de milieu.

Pour cette thèse, les types et quantités des sucres et des agents gélifiants ont été adaptés à l'expérimentation : pour la culture et l'entretien de cals embryogéniques, le saccharose est ajouté à 0,15 M et le milieu solidifié avec 1,9 g/L de Gelrite (Duchefa G1101).

Pour la réduction de l'osmolarité des protoplastes en régénération, le saccharose est utilisé à 0,15 M et le milieu de culture solidifié avec 2,3 g/L de gelrite. Pour la réduction de l'osmolarité des protoplastes en cours de régénération, le milieu MT est utilisé liquide avec une concentration de saccharose à 0,15 M ou à 0,6 M. L'induction de la régénération est réalisée avec du maltose 0,15 M liquide et en ajoutant 8 g/L d'agar pour le milieu solide. La stérilisation est faite en autoclave à 1 bar pendant 20 min à 121 °C pour les milieux solides, et par filtration à 0,22 µm pour les milieux liquides. Le pH est toujours ajusté à 5,8 avec KOH. Ces différents ajustements sont discutés plus en détail dans la partie résultat de ce manuscrit.

#### 1.4.4.5. Milieu half and half

Le milieu *half and half* (ou H+H) est une modification du milieu MT (Grosser & Gmitter, 1990). Sa préparation est décrite dans le Tableau 11. Le milieu H+H, comme le milieu MT, s'utilise pour la culture et l'entretien des cals embryogéniques d'agrumes. Le pH est ajusté à 5,8 avec KOH 1 N.

##### Milieu *Half and Half* (H+H)

| Pour 1 L:                     |        |
|-------------------------------|--------|
| Macroéléments MT 100X         | 10 mL  |
| Macroéléments BH3 100X        | 5 mL   |
| Microéléments MT 100X         | 10 mL  |
| Vitamines de Tucker (MT) 100X | 10 mL  |
| Fer MT 200X                   | 5 mL   |
| CaCl <sub>2</sub>             | 440 mg |
| Saccharose                    | 50 g   |
| Extrait de malte              | 0,5 g  |
| Glutamine                     | 1,55 g |
| Gelrite                       | 1,9 g  |

Tableau 11. Composition du milieu solide Half and Half (H+H).

#### 1.4.4.6. Milieu BH3

Le milieu BH3 (Grosser & Gmitter, 1990) est utilisé pour la culture de protoplastes d'agrumes. Sa préparation est détaillée dans le Tableau 12. Il est stérilisé par filtration à 0,22 µm, le pH est ajusté à 5,8 avec KOH 1 N.

| <b>Milieu BH3 0.6M</b>                      |         |
|---|---------|
| <b>Pour 1L :</b>                            |         |
| <b>Macroéléments BH3 100X</b>               | 10mL    |
| <b>Microéléments MT 100X</b>                | 10 mL   |
| <b>Vitamines de Tucker (MT) 100X</b>        | 10 mL   |
| <b>Fer MT 200X</b>                          | 5 mL    |
| <b>Vitamines K&amp;M 100X (Sigma K3129)</b> | 10 mL   |
| <b>Sucres-alcool 100X</b>                   | 10 mL   |
| <b>Acides Organiques 100X</b>               | 10 mL   |
| <b>Eau de coco</b>                          | 20 mL   |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b>                     | 440 mg  |
| <b>Extrait de malt</b>                      | 1 g     |
| <b>Saccharose</b>                           | 51,34 g |
| <b>Mannitol</b>                             | 82 g    |
| <b>Glutamine</b>                            | 3,1 g   |
| <b>Hydrolysats de Caséine</b>               | 250 mg  |

Tableau 12. Composition du milieu BH3 pour la culture de protoplastes.

#### 1.4.4.7. Solutions pour la préparation et la transformation de protoplastes

##### 1.4.4.7.1. Solution enzymatique

| <b>Solution Enzymatique</b>             |         |
|---|---------|
| <b>1. Mannitol</b>                      | 0,7 M   |
| <b>2. CaCl<sub>2</sub></b>              | 24,5 mM |
| <b>3. MES</b>                           | 6,15 mM |
| <b>4. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> | 0,92 mM |
| <b>5. Cellulase RS</b>                  | 1 %     |
| <b>6. Macerozyme</b>                    | 1 %     |
| <b>7. Pectolyase Y23</b>                | 0,20 %  |

Tableau 13. Solution enzymatique pour la digestion de la paroi pectocellulosique cals de pomelo.

La digestion de la paroi pectocellulosique qui entoure les cellules des cals embryogéniques de pomelo est réalisée dans un mélange de Cellulase RS (Duchefa C8003), Macerozyme R-10 (Duchefa M8002) et Pectolyase Y-23 (Duchefa P8004). Les différents constituants sont ajoutés dans un tiers du volume final d'eau ultrapure dans l'ordre spécifié dans le Tableau 13. Une fois le tout solubilisé, la solution enzymatique est filtrée à 0,22 µm et stockée à -20 °C en aliquotes de 12 ml. Une fois décongelée, le précipité observé est redissout par inversion. La solution est conservée à 4 °C pour une durée maximale de 2 semaines.

#### 1.4.4.7.2. Solution de lavage de protoplastes

La solution de lavage de protoplastes est composée de 0,6 M mannitol et 0,5 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Cette solution a un potentiel osmotique suffisant pour permettre la survie des protoplastes lors de leur isolement. Elle permet la perméabilisation de la membrane des protoplastes et élimine les sels. La solution de lavage est autoclavée et conservée à température ambiante.

#### 1.4.4.7.3. Solution CPW

La solution saline CPW (Frearson, Power, et Cocking 1973 ; Jude W. Grosser et Gmitter 1990) est utilisée pour la purification et pour l'électroporation des protoplastes. La composition de base est détaillée dans le Tableau 14. Pour la purification de protoplastes, deux solutions CPW différentes sont préparées. L'une en ajoutant à la solution de base 25 % (p/v) de saccharose et l'autre 13 % (p/v) de mannitol. Pour l'électroporation de protoplastes, la solution CPW utilisée contient 13 % mannitol et 10 mM HEPES, et le pH est ajusté 8,0 avec du KOH 1 M. La stérilisation des trois solutions est réalisée par filtration à 0,22  $\mu\text{m}$ .

| Solution de base CPW                      |              |
|---|--------------|
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 27.2 mg/L    |
| $\text{KNO}_3$                            | 100 mg/L     |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 250 mg/L     |
| $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$              | 2 mg/L       |
| KI  | 0.16 mg/L    |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,00025 mg/L |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 150 mg/L     |

Tableau 14. Composition de base de la solution CPW.

## 2. Méthodes de biologie moléculaire

### 2.1. Extraction de l'ADN génomique de plantes

Les extractions d'ADN génomique d'agrumes ont été réalisées avec le kit E.Z.N.A.<sup>®</sup> SP Plant DNA de Omega Bio-Tek en suivant le protocole décrit par le fournisseur. 10 à 100 mg de feuilles fraîches ont été broyées dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon en céramique préalablement refroidis. Après élution pour récupérer le matériel génétique purifié, les échantillons d'ADNg sont stockés à -20 °C.

### 2.2. Extraction des ARN totaux

Les extractions d'ARNm totaux d'agrumes ont été réalisées avec le kit E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plant RNA de Omega Bio-Tek en suivant le protocole décrit par le fournisseur avec quelques modifications : après ajout du tampon RB/ $\beta$ -mercaptoethanol, les échantillons sont chauffés à 56 °C pendant 3 min, sous agitation à 1400 rpm (Thermomixer R Eppendorf). L'éluion finale est répétée deux fois avec de l'eau DEPC préchauffée à 65 °C. Avant centrifugation pour récupérer le matériel génétique purifié, la solution d'éluion est mise en contact pendant 5 min avec la résine de la colonne. Une fois l'éluat récupéré, une digestion de l'ADNg est effectuée avec le kit Amplification Grade DNase I de Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, en suivant le protocole décrit par le fournisseur.

Finalement, la concentration des solutions d'ARNm totaux est mesurée à 260 nm, leur pureté est estimée par le ratio d'absorbance 260/280 nm qui doit être compris entre 1,4 et 2 (BioPhotometer Eppendorf) et une vérification sur gel d'agarose à 1 % est réalisée avant le stockage de la solution d'ARNm à -80 °C pour éviter la dégradation.

### **2.3. Synthèse d'ADNc par RT-PCR**

Une fois les ARNm totaux extraits, la synthèse des ADNc totaux est effectuée avec le kit de transcription inverse « High Capacity RNA-to-cDNA » d'Applied Biosystems<sup>®</sup>, en suivant le protocole décrit par le fournisseur. Les ADNc sont conservés à -20 °C.

### **2.4. Amplification de fragments d'ADN par PCR**

Plusieurs polymérases ont été utilisées dans ce travail de thèse pour l'amplification des fragments d'ADN par PCR. Elles ont été sélectionnées selon les besoins de l'amplification (haute ou basse fidélité, longueur du fragment, etc.). Ces enzymes sont mentionnés dans le texte du chapitre de résultats et les protocoles d'amplifications sont ceux décrits par le fournisseur.

### **2.5. qPCR**

Le kit SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Tli RNaseH Plus, Takara) a été utilisé pour effectuer les qPCR. Le mélange réactionnel déposé dans un puits contient : 10  $\mu$ L de SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Tli RNaseH Plus) (2 $\times$ ), 0,2  $\mu$ M d'amorces sens et antisens, 0,4  $\mu$ L de ROX Reference Dye (50 $\times$ ), 5  $\mu$ L d'ADNc et de l'eau ultrapure stérile pour compléter le volume à 20  $\mu$ L. Les échantillons sont déposés dans des plaques de qPCR (MicroAmp<sup>®</sup> Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode 0,1 mL d'Applied Biosystems<sup>®</sup>) et la plaque est recouverte d'un film (MicroAmp<sup>®</sup> Optical Adhesive Film d'Applied Biosystems<sup>®</sup>). Après une centrifugation d'une minute à 500  $\times$  g, la plaque de qPCR est mise dans le thermocycleur StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR System d'Applied Biosystems<sup>®</sup>. Le programme utilisé de qPCR est le suivant

: 95 °C pendant 30 sec ; puis 40 cycles : 95 °C pendant 5 sec et 60 °C pendant 34 sec. Finalement, une étape permettant de réaliser des courbes de fusion (95 °C pendant 15 sec ; 60 °C pendant 1 min et 95 °C pendant 15 sec) est ajoutée.

## **2.6. Electrophorèse et purification d'un produit de PCR**

Les fragments d'ADN sont séparés sur un gel d'agarose 1 % préparé dans du tampon TAE (Tris-Acétate 40 mM ; EDTA 1 mM). La mise en évidence de l'ADN se fait sous UV à 254 nm après un bain de 10 min dans une solution de bromure d'éthidium (BET) à 40 mg/L.

Lors de la révélation du gel d'agarose sous UV ; les bandes d'ADN de la taille d'intérêt sont découpées et purifiées par le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), en suivant le protocole décrit par le fournisseur. Ce kit permet également de purifier des produits de PCR directement à partir d'une solution de PCR sans déposer les solutions dans un gel d'agarose.

## **2.7. Ligation dans le pCR®8/GW/TOPO®**

Les ligations d'un produit de PCR amplifié à partir de l'ADNc dans le vecteur pCR8 sont réalisées avec le kit pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® d'Invitrogen™. Le mélange réactionnel de 3 µL contient : 2 µL de produit de PCR purifié, 0,5 µL de solution saline du kit diluée (1:4) et 0,5 µL de vecteur pCR®8/GW/TOPO®. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 2 h mais le temps d'incubation peut être augmenté jusqu'à une nuit si nécessaire. Le mélange est utilisé pour l'électroporation de bactéries électrocompétentes pour produire du plasmide purifié.

## **2.8. PCR sur colonies**

La vérification de la présence d'un insert désiré dans le vecteur pCR™8/GW/TOPO® est réalisée par PCR sur colonie. Les colonies sont piquées et diluées à l'aide d'un cône stérile de pipette dans 10 µL d'eau UP, dont 2 µL sont ajoutés dans un mélange réactionnel de PCR (SapphireAmp™ Fast PCR Master Mix, Takara) en utilisant l'amorce M13 et l'amorce reverse du gène inséré dans la construction afin de vérifier l'orientation dans le vecteur (la réaction de ligation n'est pas directionnelle). Le produit d'amplification, déposé sur gel d'agarose est visualisé. Si la taille du fragment correspond à la taille souhaitée, le fragment est inséré dans la bonne orientation. Dans ce cas, les 8 µL restants sont utilisés pour inoculer 5 mL de milieu LB avec de la spectinomycine. Le tout est incubé à 37 °C pendant une nuit sous agitation orbitale à 200 rpm et le plasmide est extrait.

## **2.9. LR et BP recombinaison**

La construction de vecteurs recombinants par la technologie Gateway™ consiste à transférer une séquence d'intérêt insérée dans un vecteur de clonage (comme le pCR8 ou le pDNOR™207) vers un vecteur d'expression (comme le pYeDP60\_GW, le pEAD-HT-DEST1 ou le pDE-Cas9-DsRed) par recombinaison homologe. Les kits utilisés pour faire la LR ou la BP recombinaison sont la LR Clonase™ II et la BP Clonase™ II de Thermo Fisher Scientific en suivant le protocole décrit par le fournisseur.

Pour transférer un gène d'intérêt du pCR8 vers le vecteur d'expression pYeDP60\_GW, le protocole de la LR Clonase™ II a été légèrement modifié. Le plasmide pYeDP60\_GW est linéarisé avec l'enzyme de restriction *NotI*, qui coupe au milieu de la cassette Gateway® sans toucher les sites de recombinaison. Le mélange réactionnel consiste en 100 ng de pCR8, 150 ng de pYeDP60\_GW linéarisé dans du TE pour avoir un volume final de 4 µL. 1 µL de LR Clonase™ II est ajouté et le protocole est poursuivi comme décrit par le fournisseur. Le temps d'incubation peut être ajusté de 1 h jusqu'à une nuit si nécessaire.

## **2.10. Transformation de bactéries électrocompétentes**

L'électroporation est une méthode de transformation où des cellules électrocompétentes subissent un choc électrique rapide afin de rendre leurs membranes temporairement perméables et permettant la pénétration d'un fragment d'ADN. Pour ces travaux de thèse l'électroporation de bactéries électrocompétentes a été utilisée et une approche d'électroporation de protoplastes isolés à partir de cal embryogénique de *Citrus* a été mise au point.

Dans le cas de bactéries, il faut ajouter à un aliquot de 45 µL de bactéries électrocompétentes et environ 100 ng de plasmide pour une réaction de ligation PCR8 et 1 ng pour un plasmide pur et mélanger le tout dans une cuve d'électroporation préalablement refroidie sur la glace. Le choc électrique s'effectue dans l'électroporateur Micropulser™ (Biorad). La tension appliquée est de 2,5 kV, la résistance de 200 Ω et la capacité électrique de 25 µF pour une cuve dont les électrodes sont distantes de 2 mm. Une fois le choc électrique effectué, il est nécessaire de récupérer et de resuspendre immédiatement les bactéries dans 300 µL de milieu LB liquide. La régénération des cellules s'effectue pendant 1 h à 37 °C sous agitation orbitale à 200 rpm. Finalement, la suspension bactérienne est étalée sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB solide et l'antibiotique de sélection. La boîte de Petri est incubée une nuit à 37 °C. Les colonies résultantes ayant

intégré le plasmide d'intérêt peuvent être mises en culture liquide pour extraire le vecteur. La boîte de Pétri peut être stockée plusieurs semaines à 4 °C.

### **2.11. Amplification et purification de plasmides**

Les colonies sont mises en culture dans 5 mL de milieu LB liquide additionné de l'antibiotique approprié pendant une nuit à 37 °C sous agitation orbitale à 200 rpm. Pour produire des petites quantités de vecteur (moins de 2 µg) le kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel) est utilisé à partir d'un culot bactérien issu de cultures de 2 à 5 mL. Pour produire des grandes quantités de plasmide (100 µg ou plus), des cultures de 500 mL sont réalisées et le vecteur est extrait avec le kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel).

### **2.12. Digestion de plasmides par enzymes de restriction**

L'intégrité des constructions plasmidiques peut être vérifiée par leur profil de digestion par une ou plusieurs enzymes de restriction. Ce profil est réalisé en utilisant des enzymes Fast Digest (Thermo Fisher Scientific) en suivant le protocole décrit par le fournisseur.

### **2.13. Concentration des plasmides**

La concentration des plasmides est réalisée par précipitation aux sels et à l'éthanol. Pour cela, sont ajoutés 0,1 volume d'acétate de sodium 3 N et 2,5 volumes d'éthanol absolu au vecteur à concentrer. Le mélange est homogénéisé par inversion. Le mélange est ensuite centrifugé à 11 000 g pendant 30 min à 4 °C. Le culot est séparé du surnageant puis lavé avec 2 mL d'éthanol à 70 %. Le mélange est enfin centrifugé à 11 000 g pendant 30 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot séché pendant quelques min à l'air libre et redissout dans un volume d'eau ou de tampon TE (entre 10 et 100 µl) approprié pour arriver à la concentration désirée.

## **3. Méthodes d'expression hétérologue et d'analyse de protéines**

### **3.1. Expression hétérologue d'une protéine dans la levure**

Le système d'expression hétérologue de *S. cerevisiae* est utilisé pour produire les protéines recombinantes ayant besoin de modifications post traductionnelles et pour les protéines membranaires.

### **3.1.1. Préparation de levures compétentes**

Avant de transformer des levures, il est nécessaire de les rendre compétentes. 3 types de solutions sont nécessaires 1) le tampon TE 10X (Tris 0,1 M et EDTA 10 mM, pH7,5) ; 2) la solution d'AcLi 10X (Acétate de lithium 1 M pH 7,5 ajusté à l'acide acétique) ; et 3) une solution de PEG 4000 50 % (p/V). Ces solutions sont préparées à l'avance et autoclavées.

Une colonie de levure WAT11 ou WAT21 est repiquée dans 10 mL de milieu YPGA et incubée pendant la nuit à 28 °C. Le lendemain matin, la quantité nécessaire de culture est prélevée pour ensemer 50 ml d'YPGA frais de manière que le milieu ait une densité optique de 0,2 à 700 nm. La densité optique est suivie pendant l'incubation à 30 °C (environ 5 h) et la culture est centrifugée à 3 000 *g* pendant 5 min quand la DO atteint 0,8. Le culot est lavé dans 1 mL d'eau stérile et centrifugé à 2 500 *g*, 1 min. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot est suspendu dans 1 mL d'un tampon contenant du AcLi 1X-TE 1X. Après centrifugation (2 500 *g*, 1 min), le culot est suspendu dans 200 µL de tampon AcLi 1X-TE 1X.

### **3.1.2. Transformation de levures**

Dans un microtube, 2 ml sont mélangés dans l'ordre indiqué : 10 µl d'ADN de sperme de saumon dénaturé (10 mg/ml), 10 µl de vecteur pYeDP60 recombinant contenant le gène d'intérêt (à 100-300 ng/µL), 50 µl de levures compétentes et 500 µl de AcLi 1X-TE 1X-PEG 50 %. Les tubes sont incubés pendant 30 min à 30 °C sous agitation orbitale de 160 rpm. Les mélanges sont ensuite incubés pendant 15 min dans un bain marie à 42 °C. Les tubes sont mis dans la glace pendant 1 min et ensuite centrifugés à 2 500 *g* pendant 2 min. Le surnageant est éliminé et le culot est suspendu dans 1 mL d'eau. Après 1 min de centrifugation à 2 500 *g*, le surnageant est éliminé par retournement et le culot est suspendu délicatement dans 300 µl de milieu YPGA. Les tubes sont incubés pendant 2 h à 30 °C. Finalement les levures sont lavées avec 300 µL de milieu SGI et centrifugées à 2 500 *g*, deux fois 1 min. Les levures sont finalement suspendues une dernière fois dans le même milieu avant d'être étalées sur des boîtes sélectives SGI. Des colonies blanches apparaissent après 4 ou 5 jours à 28 °C.

### **3.1.3. Expression des cytochromes P450**

La production des cytochromes P450 dans la levure est réalisée sur 4 jours consécutifs comme décrit ci-dessous :

- **Jour 1** : une colonie issue d'une levure transformée est prélevée avec une oese stérile pour inoculer 30 mL de milieu sélectif SGI. Cette préculture est incubée la nuit à 28 °C avec agitation orbitale de 160 rpm.

- **Jour 2** : après 18 h d'incubation, 200 mL de milieu YPGE sont inoculés avec 15 mL de la préculture de la veille et incubés pendant la nuit à 28 °C et sous agitation orbitale de 160 rpm.
- **Jour 3** : Après 30 h d'incubation, 10 mL d'une solution de 200 g/L de galactose sont ajoutés à la culture pour induire la production de la protéine recombinante. La solution est incubée à 18 °C pendant 16 h sous agitation orbitale de 160 rpm.
- **Jour 4** : Les levures sont prélevées pour extraire les protéines recombinantes induites. Pour l'extraction des CYP450, étant des protéines membranaires, il est nécessaire de préparer des microsomes de levure.

#### **3.1.4. Préparation de microsomes de levure**

Ce protocole est adapté de la méthode mise au point par Pompon *et al.* (1996). Toutes les étapes de préparation de microsomes sont réalisées sur la glace et les solutions utilisées sont préalablement refroidies à 4 °C. Après l'incubation des levures dans le milieu d'induction, les cultures de levures sont transvasées dans des tubes de 50 mL (4 tubes par culture) et centrifugés à 7 500 *g*, pendant 10 min à 4 °C. Les culots sont transférés dans un seul tube de 50 mL avec 30 mL de tampon TEK (50 mM Tris HCl pH 7,5 ; 1 mM EDTA pH 8 ; 100 mM KCl), qui est ensuite centrifugé à 7 500 *g* pendant 10 min à 4 °C. Le culot est resuspendu dans 2 mL de tampon d'extraction TES (50 mM Tris HCl pH 7,5 ; 1 mM EDTA pH 8 ; 0,6 M Sorbitol) en présence de 1 % d'albumine de sérum bovin et 2 mM de  $\beta$ -mercaptoethanol (12  $\mu$ L / 100 mL) (ces derniers sont ajoutés au tampon TES le jour de l'expérience). Des billes de verre de 425-600  $\mu$ m de diamètre sont ajoutées jusqu'à que celles-ci affleurent en surface de la suspension cellulaire. Le tube est bien fermé et scellé avec du Parafilm® pour éviter des éventuelles fuites et il est agité vigoureusement pendant 1 min 5 fois d'affilée, en le laissant reposer sur la glace 1 min entre chaque agitation. Les billes sont lavées 4 fois avec 10 mL de tampon d'extraction froid et le surnageant est récupéré dans un nouveau tube de 50 mL pour être centrifugé à 7 500 $\times g$  20 min à 4 °C. Le surnageant est filtré au travers de papier Miracloth® et il est transféré dans des tubes d'ultracentrifugation préalablement refroidis dans la glace. L'ultracentrifugation est réalisée pendant 1 à 2 h à 30 000 *g* et 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot est récupéré délicatement à l'aide d'une spatule dans un tube Potter-Elvehjem pour homogénéiser les microsomes avec 2 mL de tampon TEG (50 mM Tris HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8 et 30 % glycerol), en faisant attention à ne pas faire de bulles pour éviter la dénaturation des protéines. Les microsomes sont aliquotés par 500  $\mu$ L dans des tubes de 2 mL et stockés à -80 °C.

### 3.1.5. Western Blot

Une fois les microsomes de levures préparés, l'expression des protéines d'intérêt est vérifiée par immunodétection avec des anticorps spécifiques d'une queue de 6 histidines ajoutées à l'extrémité C-terminal au moment du clonage. Ceci est effectué en 2 étapes, commençant par une électrophorèse sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) pour ensuite transférer les protéines sur une membrane de polyfluorure de vinyldène (PVDF).

#### 3.1.5.1. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

Le dodécylsulfate de sodium (SDS) est un détergent fort qui dénature les protéines et leur confère une charge négative homogène pour permettre ensuite leur séparation par un courant électrique uniquement en fonction de leur poids moléculaire. Avant d'effectuer la migration, les protéines dans les échantillons de microsomes sont dosées avec le kit Qubit™ *Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific) selon le protocole décrit par le fournisseur. 50 µg de protéines totales sont prélevés et dilués dans de l'eau ultrapure pour avoir un volume final de 40 µL. Par la suite, 10 µL de tampon de charge (125 mM Tris HCl pH 6,8 ; 5 % SDS ; 20 % Glycérol ; 5 % β-mercaptoéthanol ; 0,05 % bleu de bromophénol et 400 mM dithiothréitol [DTT, ajouté le jour même]) sont ajoutés aux dilutions protéiques avant d'être chauffées pendant 10 min à 100 °C. Le gel SDS-PAGE est monté dans une cuve contenant du tampon de migration (Tris-Glycine 1× et SDS à 0,1 %, sachant que pour 1 L de tampon Tris-Glycine 10×, il faut 30,4 g de Tris et 144 g de glycine et le pH est ajusté à 8,3) puis 20 µL d'échantillon protéique et 2 µL de marqueur de poids moléculaire (Prestrained Protein Molecular Weight Marker ready-to-use #SM0441 de Thermo Scientific) sont déposés dans des puits séparés. La tension est ajustée à 80 V et la migration est effectuée jusqu'à ce que les échantillons arrivent au bas du gel.

|                            | Gel de résolution (10 %) | Gel de concentration (5%) |
|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <b>Acrylamide 30 %</b>     | 3,3 mL                   | 830 µL                    |
| <b>Tris HCl 1 M pH 8,8</b> | 3,75 mL                  | -                         |
| <b>Tris HCl 1 M pH 6,8</b> | -                        | 630 µL                    |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>      | 2,79 mL                  | 3,4 mL                    |
| <b>SDS 10 %</b>            | 100 µL                   | 50 µL                     |
| <b>TEMED</b>               | 8 µL                     | 5 µL                      |
| <b>APS 25 %</b>            | 40 µL                    | 20 µL                     |

**Tableau 15. Composition des gels de concentration et de résolution pour le SDS-PAGE.** Acrylamide/Bis-acrylamide solution à 30% (Biorad) ; TEMED = tetramethylethylenediamine (#1610801 Biorad) ; APS = Ammonium persulfate.

Les protéines migrent d'abord dans un gel de concentration qui permet une entrée homogène des échantillons dans le gel de résolution. Ce dernier permet ensuite la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. La composition des gels de concentration et de résolution est indiquée dans le Tableau 15.

### **3.1.5.2. Immunodétection**

Une membrane de PVDF Amerham-P de 0,45  $\mu\text{m}$  (GE Healthcare) est découpée à la taille du gel et immergée pendant 5 min dans de l'éthanol 96 %. La membrane est rincée et immergée dans du tampon de transfert pendant 15 min (Tris-Glycine 1 $\times$  et éthanol à 20 %) avec 4 morceaux de papier filtre Whatman<sup>TM</sup> (GE Healthcare) prédécoupés à la taille du gel et 2 mousses grises Biorad. Pour le transfert des protéines sur la membrane, le gel et la membrane sont mis en contact ferme dans le support de transfert (Mini Trans-Blot<sup>®</sup> Cell, Biorad) de la paroi noire à la blanche dans l'ordre suivant : 1 mousse grise Biorad, 2 papiers filtre, le gel après migration, la membrane PVDF, 2 papiers filtre et la deuxième mousse grise Biorad. Le support est fermé en faisant attention à bien enlever toutes les bulles et le tout est inséré dans la cuve de migration avec un bloc froid. La cuve de migration est remplie avec du tampon de transfert et la tension est fixée à 80 V pendant 30 min. Après le transfert, la membrane est rincée avec du tampon PBS-Tween (PBS 1X et Tween 20 1 %, sachant que pour 1 L de PBS 10X il faut 87,66 g de NaCl ; 14,24 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 2,01 g de KCl et 2,04 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et le pH est ajusté à 7,4).

Pour l'immunodétection, la membrane est immergée pendant 1 h à 4 °C sous agitation à 40 rpm/min dans une solution de PBS-Tween avec 5 % (p/v) de lait en poudre pour bloquer les sites aspécifiques. Après incubation, la solution est remplacée par 10 mL de PBS-Tween 5 % et du lait en poudre contenant l'anticorps primaire anti-histidine de lapin (Anti-HIS pAb MicroMol #143) dilué 1000 X. La membrane est laissée dans cette solution une nuit à 4 °C et le lendemain la solution avec l'anticorps primaire est récupérée et stockée à 4 °C pour plusieurs utilisations. La membrane est lavée trois fois pendant 10 min sous agitation avec du PBS-Tween et ensuite incubée dans une solution PBS-Tween 5 % et du lait en poudre contenant l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline (Anti-Rabbit IgG-Alkaline phosphatase de chèvre, Sigma-Aldrich) dilué 2000 fois pendant 1 h 30 min à température ambiante sous agitation. La membrane est rincée 2 fois pendant 20 min au PBS-Tween et 2 fois pendant 10 min dans du tampon Tris-NaCl (0.1 Tris M ; pH 9,6 ; 0.1 M NaCl) sous agitation à température ambiante.

Pour la révélation, la membrane est immergée dans du tampon Tris-NaCl avec 37,5  $\mu\text{L}$  de 5-bromo-4-chloro-3-indole-phosphate (BCIP à 50 mg/mL, Roche) et 50  $\mu\text{L}$  de 4-nitrobleu tétrazolium chloride (NBT à 100 mg/mL, Roche). La phosphatase alcaline des

anticorps secondaires hydrolyse les groupes phosphates du BCIP et le produit résultant est oxydé par le NBT. Ces réactions forment du diformazan qui donne la couleur violette aux bandes de protéines d'intérêt.

### **3.1.6. Criblage d'activités enzymatiques**

Une fois l'expression de la protéine d'intérêt confirmée, les microsomes sont incubés pendant 30 min à 28 °C avec différentes coumarines et furocoumarines dont les structures sont présentées dans la Figure 43. Pour cela, 40 µL de microsomes sont mélangés avec 4 µL du substrat à 10 mM (dans du DMSO) et 4 µL de NADPH à 10 mM. Les incubations sont réalisées dans des tubes de 2 mL à fond arrondi en ajustant le volume final du mélange réactionnel à 200 µL avec du tampon phosphate de sodium (NaPi) à 0,1M pH 7,5. Pour le témoin négatif, un deuxième mélange réactionnel est préparé sans NADPH pour chaque substrat. La réaction est arrêtée avec 75 µL d'acétonitrile/HCl 1 % v/v.

Deux extractions avec 800 µL d'acétate d'éthyle sont réalisées à température ambiante une fois la réaction arrêtée. Les tubes sont mélangés au vortex pendant 20 sec et centrifugés à 11 000xg pendant 5 min. Les phases supérieures sont récupérées et transférées dans un nouveau tube de 2 mL et l'acétate d'éthyle est évaporé à l'évaporateur rotatif (Concentrator plus, Eppendorf) pendant 1 h. Les extraits secs sont resuspendus dans 200 µL de méthanol à 80% et mises dans des vials pour être analysés en HPLC-UV.

## **4. Méthodes de phytochimie**

### **4.1. Extraction de furocoumarines**

Les échantillons de plantes et les cals de pomelo Star Ruby sont congelés dans de l'azote liquide pour être finement broyés dans un mortier liquide à l'aide d'un pilon préalablement refroidi avec de l'azote liquide. Une fois broyée, la poudre est pesée (20 mg pour les plantes et de 100 à 500 mg pour les cals) et mise dans un tube de 2 mL refroidi avec l'azote liquide. 800 µL de méthanol 80 % sont ajoutés et les tubes sont vortexés pendant 45 sec. Les broyats sont homogénéisés dans un bain à ultrason (Elma S70 Elmasonic) pendant 10 min, puis centrifugés à 15 000 g pendant 30 min. Le surnageant est récupéré délicatement et transféré dans un nouveau tube de 2 mL et l'extraction avec 800 µL de méthanol 80 % est répétée avec le culot. Les extraits sont placés dans l'évaporateur rotatif (Concentrator plus, Eppendorf) pendant la nuit, et une fois secs, ils sont repris dans 100 µL de méthanol 80 % en vortexant 45 sec. Les tubes sont centrifugés à 15 000 g pendant 30 min et le surnageant est transféré dans une vial pour chromatographie. Le surnageant est prélevé délicatement en faisant attention de ne pas prélever de résidus solides.

## **4.2. Analyses chromatographiques**

### **4.2.1. Analyses UPLC-MS**

Les analyses métaboliques sur les extraits de plantes et des cals de pomelo sont réalisés par chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC) Nexera de Shimadzu, équipée d'un détecteur UV (SPDM20A, Shimadzu) et combinée à un spectromètre de masse à simple quadripôle (LCMS2020, Shimadzu). La séparation et analyse des coumarines et furocoumarines se déroule comme décrit par (Dugrand et al., 2013).

### **4.2.2. Analyses HPLC-DAD des activités enzymatiques**

Pour l'analyse des extraits des incubations des microsomes, une chromatographie liquide à haute performance (Prominence, Shimadzu) a été utilisée couplée à un détecteur UV (SPD-M20A, Shimadzu), aussi appelé détecteur à barrettes de diodes (HPLC- DAD). La séparation des molécules s'effectue sur une colonne C18 en phase inverse (Lichrospher OD2 250 × 4,0 mm ; taille de particule = 5 µm, Interchim) protégée par une précolonne (taille de particule = 5 µm, Interchim). La composition des solvants est la suivante : eau ultrapure / 0,1 % d'acide formique (A) et méthanol pur / 0,1 % d'acide formique (B). Les composés sont élués par la phase mobile dont le gradient est le suivant (A : B ; v/v) : 90 : 10 jusqu'à 3 min ; 1 : 99 à 34 min ; 90 : 10 de 38 à 43 min. Les analyses sont effectuées à un débit de 0,7 mL/min et le volume d'injection est de 20 µL pour les échantillons et 5 µL pour les standards. Le temps d'analyse total est de 43 min. La détection des composés est réalisée par le détecteur UV sur des longueurs d'onde entre 200 et 600 nm.

## **5. Méthodes de culture in vitro d'agrumes**

### **5.1. Repiquage des cals**

Les cals embryogéniques de pomelo Star Ruby sont repiqués stérilement toutes les 6 semaines sur du milieu H+H ou MT avec une concentration finale de 0,15 M de Saccharose. Les cals sont prélevés sur leur partie superficielle avec des pinces préalablement stérilisées à la flamme. Ils sont ensuite cultivés à l'obscurité à 27 °C +/- 2 °C.

### **5.2. Mise en culture des cellules en suspension**

Les cultures de cellules en suspension sont initiées à partir d'une petite quantité de cals embryogéniques et la montée en échelle est réalisée progressivement comme indiqué dans

la partie 1 de résultats (cf. paragraphe 1.1.3). Un rapport 1:5 (volume du milieu : volume du contentant) a été respecté. L'incubation a été réalisée à l'obscurité à 27 °C +/- 2 °C et à 110 rpm d'agitation.

### **5.3. Isolement et purification des protoplastes à partir de cals embryogéniques de *C. paradisi***

Le protocole pour l'isolement et purification des protoplastes est réalisé comme décrit par (Grosser & Gmitter, 1990) avec le soutien technique réalisé par Dominique Dambier. Les protoplastes, dépourvus de leur paroi cellulaire, sont très sensibles aux légers changements de température, d'osmoticum et aux mouvements brusques. C'est ainsi qu'après décongélation des aliquots de milieux ou solutions, ceux-ci sont utilisés uniquement à température ambiante pour éviter l'éclatement des cellules par choc thermique. Également, tous les volumes prélevés concernant le travail avec des protoplastes doivent être effectués avec des pipettes pasteur de 3 mL en plastique stériles (VWR 612-1747). La centrifugation des protoplastes en suspension se réalise à température ambiante dans une centrifugeuse Eppendorf 5804 avec le rotor « swing » (S-4-72) et l'accélération et décélération sont fixées au minimum.

La purification de protoplastes est réalisée à partir de cals en milieu solide de 4 à 6 semaines ou avec des cultures de cellules en suspension de 20 mL de 11 jours. Avec des pinces préalablement stérilisées à la chaleur et refroidies à température ambiante, 1 ou 2 g de cals en milieu solide sont prélevés sur leur partie superficielle et déposés dans une boîte de Pétri de 60×15 mm contenant 4 mL de solution enzymatique (Tableau 13). Ensuite, les amas cellulaires sont dispersés à l'aide des pinces stériles et la boîte de Pétri est scellée avec du film plastique et placée à l'obscurité à 27 °C sous agitation à 40 rpm durant 24 h. Après une rapide observation au microscope permettant de vérifier l'intégrité des protoplastes, ceux-ci sont tamisés avec un filtre cellulaire de nylon de 40 µm (Falcon) dans un tube à centrifuger de 50 mL pour retenir et éliminer les tissus non digérés et autres débris cellulaires. Le filtre est lavé une fois avec 2 mL de solution de lavage (cf. paragraphe 1.4.4.7.2 de ce chapitre) par digestion pour récupérer un maximum de protoplastes. La solution clarifiée de protoplastes est immédiatement centrifugée à 100xg pendant 4 min. Le culot est délicatement remis en suspension à l'aide d'une pipette pasteur avec 5mL d'une solution CPW 25 % saccharose et transféré dans un tube de 15 mL. En collant la pipette à la paroi inférieure du tube penché et à quelques millimètres de la surface de la suspension de protoplastes, 2 mL d'une solution CPW 13 % mannitol sont ajoutés délicatement et doucement avec un flux constant, de manière à créer deux phases bien distinctes. Le tube est mis à centrifuger pendant 10 min à 100xg. Les protoplastes situés à l'interface de deux solutions CPW sont récupérés à l'aide d'une pipette pasteur et transférés dans des tubes

coniques de 50 mL contenant 18 mL de solution de lavage. Il faut faire attention à ne pas prélever plus de 1,5 mL de CPW 25 % saccharose, sinon les protoplastes ne précipiteront pas dans les étapes suivantes. Le tube conique est doucement inversé 3 fois, afin de bien « laver » les protoplastes. Après remise en suspension, les protoplastes sont centrifugés à 100xg, 5 min. Ce lavage est renouvelé 2 fois avec de la solution fraîche. Avant le dernier lavage, un comptage de cellules est réalisé afin de préparer les protoplastes pour l'électroporation à la densité souhaitée.

#### **5.4. Comptage de protoplastes**

Après une lente remise en suspension des protoplastes, une goutte est placée dans une cellule de Malassez recouverte d'une lamelle. Les protoplastes de trois lignes (10 rectangles chacune) sont comptés. S'il y a plus de 100 cellules par ligne, il faut diluer la solution des protoplastes et renouveler le comptage. Pour obtenir la densité de protoplastes par millilitre de solution, la moyenne de trois lignes est calculée et multipliée par  $10^4$ .

#### **5.5. Électroporation de protoplastes**

Après isolement, purification et comptage, les protoplastes sont dilués à la densité souhaitée (selon l'expérience prévue, entre  $2 \times 10^5$  à  $1 \times 10^6$  / mL) dans une solution CPW de transformation. Stérilement, 500  $\mu$ L des protoplastes sont mis dans une cuvette d'électroporation de 4 mm avec 50  $\mu$ g du vecteur utilisé pour la transformation (à 10  $\mu$ g/ $\mu$ L) et 5  $\mu$ L d'ADN de sperme de saumon à 100  $\mu$ g/ $\mu$ L. La cuvette est fermée avec un bouchon en plastique (pour conserver la stérilité des protoplastes) et insérée dans l'électroporateur, programmé selon les conditions mises au point dans la partie résultat. Après le pulse électrique, les protoplastes électroporés sont transférés délicatement dans le milieu de régénération. Si les cellules ont été transformées avec un plasmide contenant la séquence permettant l'expression d'une protéine rapporteur fluorescente, un aliquote de 50  $\mu$ L des protoplastes en régénération est mis de côté dans un tube de 2 mL. La fluorescence est observée entre 24 h et 48 h post inoculation.

# Références



## Références

- ABSO Conseil. (2016). *Etude de marché flash portant sur un projet de création d'une variété de Citrus dépourvue de furocoumarines*. SATT Grand Est.
- Al-Khayri, J. M., & Al-Bahrany, A. M. (2001). In vitro micropropagation of *Citrus aurantifolia* (lime). *Current Science*, *81*(9), 1242- 1246. Consulté à l'adresse JSTOR.
- Almeida, W. A. B. de, Mourão Filho, F. de A. A., Mendes, B. M. J., & Rodriguez, A. P. M. (2002). In vitro organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. *Scientia Agricola*, *59*(1), 35- 40. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162002000100004>
- Argüelles, N., Álvarez-González, I., Chamorro, G., & Madrigal-Bujaidar, E. (2012). Protective Effect of Grapefruit Juice on the Teratogenic and Genotoxic Damage Induced by Cadmium in Mice. *Journal of Medicinal Food*, *15*(10), 887- 893. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.0023>
- Bailey, D. G., Dresser, G. K., Kreeft, J. H., Munoz, C., Freeman, D. J., & Bend, J. R. (2000). Grapefruit-felodipine interaction: effect of unprocessed fruit and probable active ingredients. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *68*(5), 468- 477. <https://doi.org/10.1067/mcp.2000.110774>
- Bailey, David G., Dresser, G., & Arnold, J. M. O. (2013). Grapefruit–medication interactions: Forbidden fruit or avoidable consequences? *CMAJ : Canadian Medical Association Journal*, *185*(4), 309- 316. <https://doi.org/10.1503/cmaj.120951>
- Bailey, David G., Dresser, G. K., & Bend, J. R. (2003). Bergamottin, lime juice, and red wine as inhibitors of cytochrome P450 3A4 activity: comparison with grapefruit juice. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *73*(6), 529- 537. [https://doi.org/10.1016/S0009-9236\(03\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0009-9236(03)00051-1)
- Bailey, David G., Malcolm, J., Arnold, O., & Spence, J. D. (1998). Grapefruit juice–drug interactions. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *46*(2), 101- 110. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1998.00764.x>
- Bak, S., Beisson, F., Bishop, G., Hamberger, B., Höfer, R., Paquette, S., & Werck-Reichhart, D. (2011). Cytochromes P450. *The Arabidopsis Book*, *9*, e0144. <https://doi.org/10.1199/tab.0144>
- Barkley, N. A., Roose, M. L., Krueger, R. R., & Federici, C. T. (2006). Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics*, *112*(8), 1519- 1531. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0255-9>
- Bassene, J.-B., Berti, L., Costantino, G., Carcouet, E., Kamiri, M., Tomi, F., ... Froelicher, Y. (2009). Inheritance of Characters Involved in Fruit Quality in a Citrus Interspecific Allotetraploid Somatic Hybrid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(11), 5065- 5070. <https://doi.org/10.1021/jf803872f>
- Beaudoin, G. A. W., & Facchini, P. J. (2013). Isolation and characterization of a cDNA encoding (S)-cis-N-methylstylopine 14-hydroxylase from opium poppy, a key enzyme in sanguinarine

biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(3), 597- 603. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.129>

Berim, A., & Gang, D. R. (2013). The Roles of a Flavone-6-Hydroxylase and 7- O -Demethylation in the Flavone Biosynthetic Network of Sweet Basil. *Journal of Biological Chemistry*, 288(3), 1795- 1805. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.420448>

Bitters, W. P., Murashigi, T., Rangan, T. S., & Nauer, E. M. (1972). Investigations on Establishing Virus-Free Citrus Plants Through Tissue Culture. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, 5(5). Consulté à l'adresse <https://escholarship.org/uc/item/6dq074r4>

Bordón, Y., Guardiola, J. L., & García-Luis, A. (2000). Genotype Affects the Morphogenic Response in vitro of Epicotyl Segments of Citrus Rootstocks. *Annals of Botany*, 86(1), 159- 166. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1177>

Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1), 41- 52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>

Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S., & Matern, U. (2006). Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, 5(2- 3), 293- 308. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9040-2>

Bourgaud, F., Olry, A., & Hehn, A. (2014). Recent Advances in Molecular Genetics of Furanocoumarin Synthesis in Higher Plants. In C. Jacob, G. Kirsch, A. Slusarenko, P. G. Winyard, & T. Burkholz (Éd.), *Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products: From Basic Chemistry to Widespread Applications in Medicine and Agriculture* (p. 363- 375). [https://doi.org/10.1007/978-94-017-8953-0\\_14](https://doi.org/10.1007/978-94-017-8953-0_14)

Brown, S. A. (1962). Biosynthesis of Coumarin and Herniarin in Lavender. *Science*, 137(3534), 977- 978. <https://doi.org/10.1126/science.137.3534.977>

Brown, S. A. (1985). Biosynthesis of 6,7-dihydroxycoumarin in Cichorium intybus. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 63(4), 292- 295. <https://doi.org/10.1139/o85-043>

Brown, S. A., El-Dakhkhny, M., & Steck, W. (1970). Biosynthesis of linear furanocoumarins. *Canadian Journal of Biochemistry*, 48(8), 863- 871. <https://doi.org/10.1139/o70-136>

Brown, S. A., Towers, G. H. N., & Wright, D. (1960). Biosynthesis of the Coumarins. Tracer Studies on Coumarin Formation in Hierochloë Odorata and Melilotus Officinalis. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 38(2), 143- 156. <https://doi.org/10.1139/o60-016>

Calka, O., Akdeniz, N., Metin, A., & Behçet, L. (2005). Phototoxic dermatitis due to Chenopodium album in a mother and son. *Contact Dermatitis*, 53(1), 58- 60. <https://doi.org/10.1111/j.0105-1873.2005.0456e.x>

Cankar, K., van Houwelingen, A., Goedbloed, M., Renirie, R., de Jong, R. M., Bouwmeester, H., ...

- Beekwilder, J. (2014). Valencene oxidase CYP706M1 from Alaska cedar (*Callitropsis nootkatensis*). *FEBS Letters*, 588(6), 1001- 1007. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.061>
- Carimi, F. (2005). Somatic Embryogenesis Protocol: Citrus. In S. M. Jain & P. K. Gupta (Éd.), *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants* (p. 321- 343). [https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3\\_26](https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3_26)
- Chamandoosti, F. (2017). The utilities of Citrus tissue culture. *International Journal of Environmental and Agriculture Research*, 3(9), 36- 46. <https://doi.org/10.25125/agriculture-journal-IJOEAR-SEP-2017-10>
- Chen, C., Yu, Q., Wei, X., Cancalon, P. F., Gmitter, Jr., F. G., & Belzile, F. (2014). Identification of genes associated with low furanocoumarin content in grapefruit. *Genome*, 57(10), 537- 545. <https://doi.org/10.1139/gen-2014-0164>
- Chiancone, B., & Germanà, M. A. (2016). Microspore Embryogenesis Through Anther Culture in Citrus clementina Hort. ex Tan. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1359, 475- 487. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_27)
- Chudnovskiy, R., Thompson, A., Tharp, K., Hellerstein, M., Napoli, J. L., & Stahl, A. (2014). Consumption of Clarified Grapefruit Juice Ameliorates High-Fat Diet Induced Insulin Resistance and Weight Gain in Mice. *PLoS ONE*, 9(10), e108408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108408>
- Codoñer-Franch, P., & Valls-Bellés, V. (2010). Citrus as Functional Foods. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 8(4), 173- 183.
- Collonnier, C., Epert, A., Mara, K., Maclot, F., Guyon-Debast, A., Charlot, F., ... Nogué, F. (2017). CRISPR-Cas9-mediated efficient directed mutagenesis and RAD51-dependent and RAD51-independent gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biotechnology Journal*, 15(1), 122- 131. <https://doi.org/10.1111/pbi.12596>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121), 819- 823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Curk, F., Ancillo, G., Ollitrault, F., Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.-P., Garcia-Lor, A., ... Ollitrault, P. (2015). Nuclear Species-Diagnostic SNP Markers Mined from 454 Amplicon Sequencing Reveal Admixture Genomic Structure of Modern Citrus Varieties. *PLoS ONE*, 10(5), e0125628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125628>
- Dall'Acqua, F., Innocenti, G., Caporale, G., Rodighiero, P., & Guiotto, A. (2014). The Role of 5-Hydroxymarmesin in the Biogenesis of Bergapten. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 34(12), 1278-1280. <https://doi.org/10.1515/znc-1979-1236>
- Dambier, D., Benyahia, H., Pensabene-Bellavia, G., Aka Kaçar, Y., Froelicher, Y., Belfalah, Z., ... Ollitrault, P. (2011). Somatic hybridization for citrus rootstock breeding: an effective tool to solve some important issues of the Mediterranean citrus industry. *Plant Cell Reports*, 30(5), 883- 900.

<https://doi.org/10.1007/s00299-010-1000-z>

De Amicis, F., Aquila, S., Morelli, C., Guido, C., Santoro, M., Perrotta, I., ... Panno, M. L. (2015). Bergapten drives autophagy through the up-regulation of PTEN expression in breast cancer cells. *Molecular Cancer*, *14*(1), 130. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0403-4>

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., ... Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, *36*(Web Server issue), W465-469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>

Deyhim, F., Garica, K., Lopez, E., Gonzalez, J., Ino, S., Garcia, M., & Patil, B. S. (2006). Citrus juice modulates bone strength in male senescent rat model of osteoporosis. *Nutrition*, *22*(5), 559- 563. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2005.12.002>

Deyhim, F., Mandadi, K., Faraji, B., & Patil, B. S. (2008). Grapefruit Juice Modulates Bone Quality in Rats. *Journal of Medicinal Food*, *11*(1), 99- 104. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.537>

Deyhim, F., Mandadi, K., Patil, B. S., & Faraji, B. (2008). Grapefruit pulp increases antioxidant status and improves bone quality in orchidectomized rats. *Nutrition*, *24*(10), 1039- 1044. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.05.005>

Dhillon, D. S., & Brown, S. A. (1976). Localization, purification, and characterization of dimethylallylpyrophosphate:Umbelliferone dimethylallyltransferase from *Ruta graveolens*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *177*(1), 74- 83. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(76\)90417-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(76)90417-3)

Dixon, R., & Paiva, N. (1995). *Stress-induced Phenylpropanoid Metabolism*. *7*, 1085- 1097.

Dugrand, A., Olry, A., Duval, T., Hehn, A., Froelicher, Y., & Bourgaud, F. (2013). Coumarin and Furanocoumarin Quantitation in Citrus Peel via Ultrapformance Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (UPLC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(45), 10677- 10684. <https://doi.org/10.1021/jf402763t>

Dugrand-Judek, A. (2015). *Contribution à l'étude phytochimique et moléculaire de la synthèse des coumarines et furocoumarines chez diverses variétés d'agrumes du genre Citrus*. Consulté à l'adresse <http://www.theses.fr/2015LORR0238>

Dugrand-Judek, A., Olry, A., Hehn, A., Costantino, G., Ollitrault, P., Froelicher, Y., & Bourgaud, F. (2015). The Distribution of Coumarins and Furanocoumarins in Citrus Species Closely Matches Citrus Phylogeny and Reflects the Organization of Biosynthetic Pathways. *PLoS ONE*, *10*(11), e0142757. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142757>

Fausser, F., Schiml, S., & Puchta, H. (2014). Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *79*(2), 348- 359. <https://doi.org/10.1111/tpj.12554>

Federici, C. T., Fang, D. Q., Scora, R. W., & Roose, M. L. (1998). Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and*

*Applied Genetics*, 96(6), 812- 822. <https://doi.org/10.1007/s001220050807>

Feng, Z., Mao, Y., Xu, N., Zhang, B., Wei, P., Yang, D.-L., ... Zhu, J.-K. (2014). Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(12), 4632- 4637. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400822111>

Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D.-L., Wei, P., ... others. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research*, 23(10), 1229.

Fidel, L., Carmeli-Weissberg, M., Yaniv, Y., Shaya, F., Dai, N., Raveh, E., ... Carmi, N. (2016). Breeding and Analysis of Two New Grapefruit-Like Varieties with Low Furanocoumarin Content. *Food and Nutrition Sciences*, 07(02), 90- 101. <https://doi.org/10.4236/fns.2016.72011>

Fleming, G. H., Olivares-Fuster, O., Del-Bosco, S. F., & Grosser, J. W. (2000). An alternative method for the genetic transformation of sweet orange. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36(6), 450.

Food and Agriculture Organization. (s. d.). FAOSTAT: Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database. Consulté 10 février 2019, à l'adresse <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>

Frearson, E. M., Power, J. B., & Cocking, E. C. (1973). The isolation, culture and regeneration of Petunia leaf protoplasts. *Developmental Biology*, 33(1), 130- 137. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(73\)90169-3](https://doi.org/10.1016/0012-1606(73)90169-3)

Froelicher, Y., Mouhaya, W., Bassene, J.-B., Costantino, G., Kamiri, M., Luro, F., ... Ollitrault, P. (2011). New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genetics & Genomes*, 7(1), 49- 61. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0314-x>

Fukuda, K., Guo, L., Ohashi, N., Yoshikawa, M., & Yamazoe, Y. (2000). Amounts and variation in grapefruit juice of the main components causing grapefruit–drug interaction. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 741(2), 195- 203. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00104-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00104-3)

Gao, J., Wang, G., Ma, S., Xie, X., Wu, X., Zhang, X., ... Xia, Q. (2015). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*, 87(1- 2), 99- 110. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0263-0>

García-Lor, A., Curk, F., Snoussi-Trifa, H., Morillon, R., Ancillo, G., Luro, F., ... Ollitrault, P. (2013). A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the 'true citrus fruit trees' group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. *Annals of Botany*, 111(1), 1- 19. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs227>

García-Lor, A., Luro, F., Navarro, L., & Ollitrault, P. (2012). Comparative use of InDel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated citrus genetic diversity: a perspective for genetic association studies. *Molecular Genetics and Genomics*, 287(1), 77- 94.

<https://doi.org/10.1007/s00438-011-0658-4>

García-luis, A., Bordón, Y., Moreira-dias, J. M., Molina, R. V., & Guardiola, J. L. (1999). Explant Orientation and Polarity Determine the Morphogenic Response of Epicotyl Segments of Troyer Citrange. *Annals of Botany*, 84(6), 715- 723. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.0972>

García-Luis, A., Molina, R. V., Varona, V., Castelló, S., & Guardiola, J. L. (2006). The influence of explant orientation and contact with the medium on the pathway of shoot regeneration in vitro in epicotyl cuttings of Troyer citrange. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85(2), 137- 144. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9060-4>

Gavira, C., Höfer, R., Lesot, A., Lambert, F., Zucca, J., & Werck-Reichhart, D. (2013). Challenges and pitfalls of P450-dependent (+)-valencene bioconversion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 18, 25- 35. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2013.02.003>

Ge, Z.-C., Qu, X., Yu, H.-F., Zhang, H.-M., Wang, Z.-H., & Zhang, Z.-T. (2016). Antitumor and apoptotic effects of bergaptol are mediated via mitochondrial death pathway and cell cycle arrest in human breast carcinoma cells. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(2), 489- 494. <https://doi.org/10.3329/bjp.v11i2.24644>

Ghorbel, R., Navarro, L., & Duran-Vila, N. (1998). Morphogenesis and regeneration of whole plants of grapefruit (*Citrus paradisi*), sour orange (*C. aurantium*) and alemow (*C. macrophylla*). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 73(3), 323- 327. <https://doi.org/10.1080/14620316.1998.11510981>

Girenavar, B., Jayaprakasha, G. K., Jadegoud, Y., Nagana Gowda, G. A., & Patil, B. S. (2007). Radical scavenging and cytochrome P450 3A4 inhibitory activity of bergaptol and geranylcoumarin from grapefruit. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(11), 3684- 3691. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.03.047>

Gmitter, F. (2015). *Patent N° US PP26,177 P3*. Consulté à l'adresse <https://patentimages.storage.googleapis.com/79/51/4a/1e202362cccd5f/USPP26177.pdf>

Gmitter, F. G., & Moore, G. A. (1986). Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: Embryo production, germination, and plant survival. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 6(2), 139- 147. <https://doi.org/10.1007/BF00180797>

Gravot, A., Larbat, R., Hehn, A., Lièvre, K., Gontier, E., Goergen, J.-L., & Bourgaud, F. (2004). Cinnamic acid 4-hydroxylase mechanism-based inactivation by psoralen derivatives: cloning and characterization of a C4H from a psoralen producing plant—*Ruta graveolens*—exhibiting low sensitivity to psoralen inactivation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 422(1), 71- 80. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.12.013>

Groppo, M., Pirani, J. R., Salatino, M. L. F., Blanco, S. R., & Kallunki, J. A. (2008). Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. *American Journal of Botany*, 95(8), 985- 1005. <https://doi.org/10.3732/ajb.2007313>

- Grosser, J. W., Čalović, M., & Louzada, E. S. (2010). Protoplast Fusion Technology – Somatic Hybridization and Cybridization. In *Plant Cell Culture* (p. 175- 198). <https://doi.org/10.1002/9780470686522.ch10>
- Grosser, J. W., Chandler, J. L., & Duncan, L. W. (2007). Production of mandarin+pummelo somatic hybrid citrus rootstocks with potential for improved tolerance/resistance to sting nematode. *Scientia Horticulturae*, *113*(1), 33- 36. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.01.033>
- Grosser, J. W., & Gmitter, F. G. (1990). Protoplast Fusion and Citrus Improvement. In *Plant Breeding Reviews* (p. 339- 374). <https://doi.org/10.1002/9781118061053.ch10>
- Grosser, J. W., & Gmitter, F. G. (2011a). Protoplast Fusion and Citrus Improvement. In *Plant Breeding Reviews* (p. 339- 374). <https://doi.org/10.1002/9781118061053.ch10>
- Grosser, J. W., & Gmitter, F. G. (2011b). Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *104*(3), 343- 357. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9823-4>
- Grosser, J. W., Gmitter, F. G., Tusa, N., Recupero, G. R., & Cucinotta, P. (1996). Further evidence of a cybridization requirement for plant regeneration from citrus leaf protoplasts following somatic fusion. *Plant Cell Reports*, *15*(9), 672- 676. <https://doi.org/10.1007/BF00231922>
- Grosser, J. W., Ollitrault, P., & Olivares-Fuster, O. (2000). Somatic hybridization in citrus: An effective tool to facilitate variety improvement. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *36*(6), 434- 449. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0080-9>
- Guo, L. Q., & Yamazoe, Y. (2004). Inhibition of cytochrome P450 by furanocoumarins in grapefruit juice and herbal medicines. *Acta Pharmacologica Sinica*, *25*(2), 129- 136.
- Hamberger, B., & Bak, S. (2013). Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *368*(1612). <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0426>
- Hamerski, D., Beier, R. C., Kneusel, R. E., Matern, U., & Himmelpacht, K. (1990). Accumulation of coumarins in elicitor-treated cell suspension cultures of Ammi majus. *Phytochemistry*, *29*(4), 1137- 1142. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)85418-F](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85418-F)
- Hamerski, D., & Matern, U. (1988). Biosynthesis of psoralens Psoralen 5-monooxygenase activity from elicitor-treated Ammi majus cells. *FEBS Letters*, *239*(2), 263- 265. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80930-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80930-X)
- Hassanein, A. M., & Azooz, M. M. (2003). Propagation of Citrus reticulata via in vitro Seed Germination and Shoot Cuttings. *Biologia Plantarum*, *47*(2), 173- 177. <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000022247.46798.59>
- He, K., Iyer, K. R., Hayes, R. N., Sinz, M. W., Woolf, T. F., & Hollenberg, P. F. (1998). Inactivation of Cytochrome P450 3A4 by Bergamottin, a Component of Grapefruit Juice. *Chemical Research in*

*Toxicology*, 11(4), 252–259. <https://doi.org/10.1021/tx970192k>

Hemann, M., Lukačič, R., Ekiert, H., & Matern, U. (2004). Furanocoumarin biosynthesis in *Ammi majus* L.: Cloning of bergapton O-methyltransferase. *European Journal of Biochemistry*, 271(5), 932–940. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.03995.x>

Hidaka, T., Yamada, Y., & Shichijo, T. (1979). In vitro Differentiation of Haploid Plants by Anther Culture in *Poncirus trifoliata* (L.) RAF. *Japanese Journal of Breeding*, 29(3), 248–254. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.29.248>

Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>

Hung, C.-F., Prapaipong, H., Berenbaum, M. R., & Schuler, M. A. (1995). Differential induction of cytochrome P450 transcripts in *Papilio polyxenes* by linear and angular furanocoumarins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25(1), 89–99.

Hung, W.-L., Suh, J. H., & Wang, Y. (2017). Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.008>

Ilc, T., Arista, G., Tavares, R., Navrot, N., Duchêne, E., Velt, A., ... Rustenholz, C. (2018). Annotation, classification, genomic organization and expression of the *Vitis vinifera* CYPome. *PLoS ONE*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199902>

Jia, H., Orbović, V., Jones, J. B., & Wang, N. (2016). Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I CsLOB1 promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating XccApthA4:dCsLOB1.3 infection. *Plant Biotechnology Journal*, 14(5), 1291–1301. <https://doi.org/10.1111/pbi.12495>

Jia, H., & Wang, N. (2014). Targeted Genome Editing of Sweet Orange Using Cas9/sgRNA. *PLoS ONE*, 9(4), e93806. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093806>

Jia, H., Xu, J., Orbović, V., Zhang, Y., & Wang, N. (2017). Editing Citrus Genome via SaCas9/sgRNA System. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02135>

Jia, H., Zhang, Y., Orbović, V., Xu, J., White, F. F., Jones, J. B., & Wang, N. (2017). Genome editing of the disease susceptibility gene *CsLOB1* in citrus confers resistance to citrus canker. *Plant Biotechnology Journal*, 15(7), 817–823. <https://doi.org/10.1111/pbi.12677>

Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., & Weeks, D. P. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research*, 41(20), e188–e188. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt780>

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

- Karamat, F., Olry, A., Munakata, R., Koeduka, T., Sugiyama, A., Paris, C., ... Yazaki, K. (2014). A coumarin-specific prenyltransferase catalyzes the crucial biosynthetic reaction for furanocoumarin formation in parsley. *The Plant Journal*, 77(4), 627- 638. <https://doi.org/10.1111/tpj.12409>
- Kayim, M., & Koc, N. K. (2006). The effects of some carbohydrates on growth and somatic embryogenesis in citrus callus culture. *Scientia Horticulturae*, 109(1), 29- 34. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.040>
- Khan, I. A. (2007). *Citrus genetics, breeding and biotechnology*. Wallingford, UK ; Cambridge, MA: CABI.
- Kim, S.-M., Lee, J. H., Sethi, G., Kim, C., Baek, S. H., Nam, D., ... Ahn, K. S. (2014). Bergamottin, a natural furanocoumarin obtained from grapefruit juice induces chemosensitization and apoptosis through the inhibition of STAT3 signaling pathway in tumor cells. *Cancer Letters*, 354(1), 153- 163. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.08.002>
- Kimura, Y., Ito, H., Ohnishi, R., & Hatano, T. (2010). Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(1), 429- 435. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.10.041>
- Kliebenstein, D. J., & Osbourn, A. (2012). Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 15(4), 415- 423. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.005>
- Kobayashi, S., Uchimiya, H., & Ikeda, I. (1983). Plant Regeneration from « Trovita » Orange Protoplasts. *Japanese Journal of Breeding*, 33(2), 119- 122. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.33.119>
- Korotkova, A. M., Gerasimova, S. V., & Khlestkina, E. K. (2019). Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 23(1), 29- 37. <https://doi.org/10.18699/VJ19.458>
- Krieger, C. (2014). *Identification moléculaire et caractérisation fonctionnelle d'une*. 325.
- Krieger, C., Roselli, S., Kellner-Thielmann, S., Galati, G., Schneider, B., Grosjean, J., ... Hehn, A. (2018). The CYP71AZ P450 Subfamily: A Driving Factor for the Diversification of Coumarin Biosynthesis in Apiaceous Plants. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00820>
- Krishnan, P., Yan, K. J., Windler, D., Tubbs, J., Grand, R., Li, B. D., ... Kleiner-Hancock, H. E. (2009). Citrus auraptene suppresses cyclin D1 and significantly delays N-methyl nitrosourea induced mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *BMC Cancer*, 9(1), 259. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-259>
- Kruse, T., Ho, K., Yoo, H.-D., Johnson, T., Hippely, M., Park, J.-H., ... Bobzin, S. (2008). In Planta Biocatalysis Screen of P450s Identifies 8-Methoxypsoralen as a Substrate for the CYP82C Subfamily, Yielding Original Chemical Structures. *Chemistry & Biology*, 15(2), 149- 156.

<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.01.008>

Larbat, R., Hehn, A., Hans, J., Schneider, S., Jugde, H., Schneider, B., ... Bourgaud, F. (2009). Isolation and Functional Characterization of CYP71AJ4 Encoding for the First P450 Monooxygenase of Angular Furanocoumarin Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(8), 4776- 4785. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807351200>

Larbat, R., Kellner, S., Specker, S., Hehn, A., Gontier, E., Hans, J., ... Matern, U. (2007). Molecular Cloning and Functional Characterization of Psoralen Synthase, the First Committed Monooxygenase of Furanocoumarin Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 542- 554. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604762200>

Lee, S., Badieyan, S., Bevan, D. R., Herde, M., Gatz, C., & Tholl, D. (2010). Herbivore-induced and floral homoterpene volatiles are biosynthesized by a single P450 enzyme (CYP82G1) in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(49), 21205- 21210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009975107>

Lin, C., Hsu, C., Yang, L., Lee, L., Fu, J., Cheng, Q., ... Shih, M. (2018). Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. *Plant Biotechnology Journal*, 16(7), 1295- 1310. <https://doi.org/10.1111/pbi.12870>

Liu, F., Jiang, H., Ye, S., Chen, W.-P., Liang, W., Xu, Y., ... Li, C. (2010). The Arabidopsis P450 protein CYP82C2 modulates jasmonate-induced root growth inhibition, defense gene expression and indole glucosinolate biosynthesis. *Cell Research*, 20(5), 539- 552. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.36>

Luo, P., Wang, Y. H., Wang, G. D., Essenberg, M., & Chen, X. Y. (2001). Molecular cloning and functional identification of (+)-delta-cadinene-8-hydroxylase, a cytochrome P450 mono-oxygenase (CYP706B1) of cotton sesquiterpene biosynthesis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 28(1), 95- 104.

Madrigal-Bujaidar, E., Martino Roaro, L., García Aguirre, K., García-Medina, S., & Alvarez-Gonzalez, I. (2013). *Grapefruit Juice Suppresses AOM-induced Colon ACF and Induces the Antioxidant Capacity in Mice*. 14(11), 6851- 6856.

Mahgoub, A. A. (2002). Grapefruit juice potentiates the anti-inflammatory effects of diclofenac on the carrageenan-induced rat's paw oedema. *Pharmacological Research*, 45(1), 1- 4. <https://doi.org/10.1006/phrs.2001.0856>

Malhotra, S., Bailey, D. G., Paine, M. F., & Watkins, P. B. (2001). Seville orange juice-felodipine interaction: comparison with dilute grapefruit juice and involvement of furocoumarins. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(1), 14- 23. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113185>

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., ... Church, G. M. (2013). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823- 826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>

Matern, U., Strasser, H., Wendorff, H., & Hamerski, D. (1988). CHAPTER 1 - Coumarins and

- Furanocoumarins. In F. Constabel & I. K. Vasil (Éd.), *Phytochemicals in Plant Cell Cultures* (p. 3- 21). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-715005-5.50008-X>
- Mathur, J., & Koncz, C. (1998). PEG-Mediated Protoplast Transformation with Naked DNA. In J. M. Martinez-Zapater & J. Salinas (Éd.), *Arabidopsis Protocols* (p. 267- 276). <https://doi.org/10.1385/0-89603-391-0:267>
- Melough, M. M., Cho, E., & Chun, O. K. (2018). Furocoumarins: A review of biochemical activities, dietary sources and intake, and potential health risks. *Food and Chemical Toxicology*, *113*, 99- 107. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.030>
- Meng, F., Xiong, Z., Sun, Y., & Li, F. (2004). *Coumarins from Cnidium monnieri (L.) and their proliferation stimulating activity on osteoblast-like UMR106 cells*. Consulté à l'adresse <https://www.ingentaconnect.com/content/govi/pharmaz/2004/00000059/00000008/art00016>
- Messer, A., Raquet, N., Lohr, C., & Schrenk, D. (2012). Major furocoumarins in grapefruit juice II: Phototoxicity, photogenotoxicity, and inhibitory potency vs. cytochrome P450 3A4 activity. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(3- 4), 756- 760. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.11.023>
- Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., ... Qu, L.-J. (2013). Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Research*, *23*(10), 1233.
- Mittapelli, S. R., Maryada, S. K., Khareedu, V. R., & Vudem, D. R. (2014). Structural organization, classification and phylogenetic relationship of cytochrome P450 genes in Citrus clementina and Citrus sinensis. *Tree Genetics & Genomes*, *10*(2), 399- 409. <https://doi.org/10.1007/s11295-013-0695-8>
- Miyata, M., Takano, H., Takahashi, K., Sasaki, Y. F., & Yamazoe, Y. (2002). Suppression of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced DNA damage in rat colon after grapefruit juice intake. *Cancer Letters*, *183*(1), 17- 22. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00109-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00109-X)
- Moreira-Dias, J. M., Molina, R. V., Bordón, Y., Guardiola, J. L., & García-Luis, A. (2000). Direct and Indirect Shoot Organogenic Pathways in Epicotyl Cuttings of Troyer Citrange Differ in Hormone Requirements and in their Response to Light. *Annals of Botany*, *85*(1), 103- 110.
- Moreira-Dias, J. M., Molina, R. V., Guardiola, J. L., & García-Luis, A. (2001). Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. *Scientia Horticulturae*, *87*(4), 275- 290. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(00\)00186-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(00)00186-2)
- Morineau, C., Bellec, Y., Tellier, F., Gissot, L., Kelemen, Z., Nogué, F., & Faure, J.-D. (2017). Selective gene dosage by CRISPR-Cas9 genome editing in hexaploid *Camelina sativa*. *Plant Biotechnology Journal*, *15*(6), 729- 739. <https://doi.org/10.1111/pbi.12671>
- Mousavi, S. H., Davari, A.-S., Iranshahi, M., Sabouri-Rad, S., & Tayarani Najaran, Z. (2015). Comparative analysis of the cytotoxic effect of 7-prenyloxycoumarin compounds and herniarin on MCF-7 cell line. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, *5*(6), 520- 530.

Munakata, R., Inoue, T., Koeduka, T., Karamat, F., Olry, A., Sugiyama, A., ... Yazaki, K. (2014). Molecular Cloning and Characterization of a Geranyl Diphosphate-Specific Aromatic Prenyltransferase from Lemon. *Plant Physiology*, 166(1), 80-90. <https://doi.org/10.1104/pp.114.246892>

Munakata, R., Inoue, T., Koeduka, T., Sasaki, K., Tsurumaru, Y., Sugiyama, A., ... Yazaki, K. (2012). Characterization of Coumarin-Specific Prenyltransferase Activities in *Citrus limon* Peel. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(7), 1389-1393. <https://doi.org/10.1271/bbb.120192>

Munakata, R., Olry, A., Karamat, F., Courdavault, V., Sugiyama, A., Date, Y., ... Hehn, A. (2016). Molecular evolution of parsnip (*Pastinaca sativa*) membrane-bound prenyltransferases for linear and/or angular furanocoumarin biosynthesis. *New Phytologist*, 211(1), 332-344. <https://doi.org/10.1111/nph.13899>

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Murashige, T., & Tucker, D. (1969). Growth factor requirements of citrus tissue culture. *Proc. 1st Intl. Citrus Symp*, 3, 1155-1161.

Myung, K., Narciso, J. A., & Manthey, J. A. (2008). Removal of Furanocoumarins in Grapefruit Juice by Edible Fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 12064-12068. <https://doi.org/10.1021/jf802713g>

Nelson, D. R. (2009). The cytochrome p450 homepage. *Human Genomics*, 4(1), 59-65.

Nelson, D., & Werck-Reichhart, D. (2011). A P450-centric view of plant evolution. *The Plant Journal*, 66(1), 194-211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04529.x>

Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G., & Tribulato, E. (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(8), 1155-1166. <https://doi.org/10.1007/s001220051419>

Niedz, R. P., McKendree, W. L., & Shatters, R. C. (2003). Electroporation of embryogenic protoplasts of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) and regeneration of transformed plants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 39(6), 586-594. <https://doi.org/10.1079/IVP2003463>

Ohnishi, A., Matsuo, H., Yamada, S., Takanaga, H., Morimoto, S., Shoyama, Y., ... Sawada, Y. (2000). Effect of furanocoumarin derivatives in grapefruit juice on the uptake of vinblastine by Caco-2 cells and on the activity of cytochrome P450 3A4. *British Journal of Pharmacology*, 130(6), 1369-1377. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703433>

Ohta, T., Maruyama, T., Nagahashi, M., Miyamoto, Y., Hosoi, S., Kiuchi, F., ... Tsukamoto, S. (2002). Paradisin C: a new CYP3A4 inhibitor from grapefruit juice. *Tetrahedron*, 58(33), 6631-6635. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)00739-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)00739-1)

- Ollitrault, P., Terol, J., Garcia-Lor, A., Bérard, A., Chauveau, A., Froelicher, Y., ... Talon, M. (2012). SNP mining in *C. clementina* BAC end sequences; transferability in the Citrus genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. *BMC Genomics*, *13*(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-13>
- Omar, A. A., Song, W.-Y., & Grosser, J. W. (2007). Introduction of Xa21, a Xanthomonas-resistance gene from rice, into 'Hamlin' sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] using protoplast-GFP co-transformation or single plasmid transformation. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *82*(6), 914- 923. <https://doi.org/10.1080/14620316.2007.11512326>
- Omar, Ahmad A., Dutt, M., Gmitter, F. G., & Grosser, J. W. (2016). Somatic Embryogenesis: Still a Relevant Technique in Citrus Improvement. In M. A. Germana & M. Lambardi (Éd.), *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants* (Vol. 1359, p. 289- 327). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_13)
- Paine, M. F., Widmer, W. W., Hart, H. L., Pusek, S. N., Beavers, K. L., Criss, A. B., ... Watkins, P. B. (2006). A furanocoumarin-free grapefruit juice establishes furanocoumarins as the mediators of the grapefruit juice-felodipine interaction. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *83*(5), 1097- 1105. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.5.1097>
- Panno, M. L., Giordano, F., Palma, M. G., Bartella, V., Rago, V., Maggiolini, M., ... Ando, S. (2009). Evidence that Bergapten, Independently of its Photoactivation, Enhances p53 Gene Expression and Induces Apoptosis in Human Breast Cancer Cells. *Current Cancer Drug Targets*. <https://doi.org/info:doi/10.2174/156800909788486786>
- Paquette, S. M., Bak, S., & Feyereisen, R. (2000). Intron–Exon Organization and Phylogeny in a Large Superfamily, the Paralogous Cytochrome P450 Genes of *Arabidopsis thaliana*. *DNA and Cell Biology*, *19*(5), 307- 317. <https://doi.org/10.1089/10445490050021221>
- Pati, P. K., Sharma, M., & Ahuja, P. S. (2005). Extra thin alginate film: an efficient technique for protoplast culture. *Protoplasma*, *226*(3- 4), 217- 221. <https://doi.org/10.1007/s00709-005-0096-4>
- Peterson, J. J., Beecher, G. R., Bhagwat, S. A., Dwyer, J. T., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2006). Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*, S74- S80. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.12.009>
- Phuwapraisirisan, P., Surapinit, S., & Tip-pyang, S. (2006). A novel furanocoumarin from *Feroniella lucida* exerts protective effect against lipid peroxidation. *Phytotherapy Research*, *20*(8), 708- 710. <https://doi.org/10.1002/ptr.1930>
- Pierrel, M. A., Batard, Y., Kazmaier, M., Mignotte-Vieux, C., Durst, F., & Werck-Reichhart, D. (1994). Catalytic Properties of the Plant Cytochrome P450 CYP73 Expressed in Yeast. *European Journal of Biochemistry*, *224*(3), 835- 844. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00835.x>
- Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A., & Urban, P. (1996). Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods in Enzymology*, *272*, 51- 64.

Rajniak, J., Barco, B., Clay, N. K., & Sattely, E. S. (2015). A new cyanogenic metabolite in *Arabidopsis* required for inducible pathogen defence. *Nature*, 525(7569), 376- 379. <https://doi.org/10.1038/nature14907>

Rajniak, J., Giehl, R. F. H., Chang, E., Murgia, I., von Wirén, N., & Sattely, E. S. (2018). Biosynthesis of redox-active metabolites in response to iron deficiency in plants. *Nature Chemical Biology*, 14(5), 442- 450. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0019-2>

Razo-Aguilera, G., Baez-Reyes, R., Álvarez-González, I., Paniagua-Pérez, R., & Madrigal-Bujaidar, E. (2011). Inhibitory effect of grapefruit juice on the genotoxicity induced by hydrogen peroxide in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 49(11), 2947- 2953. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.07.003>

Robineau, T., Batard, Y., Nedelkina, S., Cabello-Hurtado, F., LeRet, M., Sorokine, O., ... Werck-Reichhart, D. (1998). The Chemically Inducible Plant Cytochrome P450 CYP76B1 Actively Metabolizes Phenylureas and Other Xenobiotics. *Plant Physiology*, 118(3), 1049- 1056. <https://doi.org/10.1104/pp.118.3.1049>

Robl, M., Robl, R., Marinoni, L. P., Abagge, K. T., & Carvalho, V. O. (2013). Assemble the puzzle: bizarre-looking lesions. *Archives of Disease in Childhood*, 98(11), 915. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304407>

Roselli, S., Olry, A., Vautrin, S., Coriton, O., Ritchie, D., Galati, G., ... Hehn, A. (2017). A bacterial artificial chromosome (BAC) genomic approach reveals partial clustering of the furanocoumarin pathway genes in parsnip. *The Plant Journal*, 89(6), 1119- 1132. <https://doi.org/10.1111/tpj.13450>

Schaefer, D. G., Delacote, F., Charlot, F., Vrielynck, N., Guyon-Debast, A., Le Guin, S., ... Nogué, F. (2010). RAD51 loss of function abolishes gene targeting and de-represses illegitimate integration in the moss *Physcomitrella patens*. *DNA Repair*, 9(5), 526- 533. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2010.02.001>

Schoch, G. A. (2002). Chemical Inactivation of the Cinnamate 4-Hydroxylase Allows for the Accumulation of Salicylic Acid in Elicited Cells. *Plant Physiology*, 130(2), 1022- 1031. <https://doi.org/10.1104/pp.004309>

Semenova, E., Nagornykh, M., Pyatnitskiy, M., Artamonova, I. I., & Severinov, K. (2009). Analysis of CRISPR system function in plant pathogen *Xanthomonas oryzae*. *FEMS Microbiology Letters*, 296(1), 110- 116. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01626.x>

Siminszky, B., Gavilano, L., Bowen, S. W., & Dewey, R. E. (2005). Conversion of nicotine to nornicotine in *Nicotiana tabacum* is mediated by CYP82E4, a cytochrome P450 monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(41), 14919- 14924. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506581102>

Singh, S., & Rajam, M. V. (2009). Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(1), 3- 22. <https://doi.org/10.1007/s12298-009-0001-2>

Siwinska, J., Siatkowska, K., Olry, A., Grosjean, J., Hehn, A., Bourgaud, F., ... Ilnatowicz, A. (2018). Scopoletin 8-hydroxylase: a novel enzyme involved in coumarin biosynthesis and iron-deficiency responses in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *69*(7), 1735-1748. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery005>

Swingle, W., & Reece, P. (1967). The botany of Citrus and its wild relatives. Rs. In *The citrus industry* (Reuther W, Webber H, Batchelor L, p. 190- 430). Berkeley, CA: University of California.

Tanaka, T. (1977). *Fundamental discussion of Citrus classification*. *14*, 1- 6.

Tang, C.-H., Yang, R.-S., Chien, M.-Y., Chen, C.-C., & Fu, W.-M. (2008). Enhancement of bone morphogenetic protein-2 expression and bone formation by coumarin derivatives via p38 and ERK-dependent pathway in osteoblasts. *European Journal of Pharmacology*, *579*(1), 40- 49. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.10.013>

Teutsch, H. G., Hasenfratz, M. P., Lesot, A., Stoltz, C., Garnier, J. M., Jeltsch, J. M., ... Werck-Reichhart, D. (1993). Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(9), 4102- 4106. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4102>

Thompson, H. J., Sharma, S. K., & Brown, S. A. (1978). O-methyltransferases of furanocoumarin biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *188*(2), 272- 281.

Thorpe, T. A., & Yeung, E. C. (2011). *Plant Embryo Culture: Methods and Protocols*. Consulté à l'adresse <https://www.springer.com/jp/book/9781617379871>

Tomaz, M. L., Januzzi Mendes, B. M., Mourão Filho, F. D. A. A., Demétrio, C. G. B., Jansakul, N., & Martinelli Rodriguez, A. P. (2001). Somatic embryogenesis in Citrus SPP.: Carbohydrate stimulation and histodifferentiation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *37*(4), 446. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0078-y>

Uesawa, Y., & Mohri, K. (2006a). The Use of Heat Treatment to Eliminate Drug Interactions Due to Grapefruit Juice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *29*(11), 2274- 2278. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.2274>

Uesawa, Y., & Mohri, K. (2006b). UV-Irradiated Grapefruit Juice Loses Pharmacokinetic Interaction with Nifedipine in Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *29*(6), 1286- 1289. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1286>

USDA, E., Statistics and Market Information System. (2018). *Citrus: World Markets and Trade*. Consulté à l'adresse Foreign Agricultural Service website: <https://usda.library.cornell.edu/concern/publications/w66343603?locale=en>

Usman, M., Sana, M., & Fatima, B. (2005). In vitro multiple shoot induction from nodal explants of Citrus Cultivars. *Journal of Central European Agriculture*, *6*(4), 435- 442.

Uto, T., Tung, N. H., Taniyama, R., Miyanowaki, T., Morinaga, O., & Shoyama, Y. (2015). Anti-inflammatory Activity of Constituents Isolated from Aerial Part of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Phytotherapy Research*, 29(12), 1956- 1963. <https://doi.org/10.1002/ptr.5490>

Vardi, A., Spiegel-Roy, P., & Galun, E. (1982). Plant regeneration from Citrus protoplasts: Variability in methodological requirements among cultivars and species. *Theoretical and Applied Genetics*, 62(2), 171- 176. <https://doi.org/10.1007/BF00293354>

Vialart, G., Hehn, A., Olry, A., Ito, K., Krieger, C., Larbat, R., ... Bourgaud, F. (2012). A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Ruta graveolens* L. exhibits p-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase activity (C2'H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 70(3), 460- 470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04879.x>

Voo, S. S., Grimes, H. D., & Lange, B. M. (2012). Assessing the Biosynthetic Capabilities of Secretory Glands in Citrus Peel. *Plant Physiology*, 159(1), 81- 94. <https://doi.org/10.1104/pp.112.194233>

Wang, C.-C., Lai, J.-E., Chen, L.-G., Yen, K.-Y., & Yang, L.-L. (2000). Inducible nitric oxide synthase inhibitors of Chinese herbs. Part 2: Naturally occurring furanocoumarins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 8(12), 2701- 2707. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(00\)00200-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(00)00200-5)

Wang, M., Wang, G., Ji, J., & Wang, J. (2009). The effect of pds gene silencing on chloroplast pigment composition, thylakoid membrane structure and photosynthesis efficiency in tobacco plants. *Plant Science*, 177(3), 222- 226. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.04.006>

Wangensteen, H., Molden, E., Christensen, H., & Malterud, K. E. (2003). Identification of epoxybergamottin as a CYP3A4 inhibitor in grapefruit peel. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 58(10), 663- 668. <https://doi.org/10.1007/s00228-002-0537-3>

Wu, G. A., Prochnik, S., Jenkins, J., Salse, J., Hellsten, U., Murat, F., ... Rokhsar, D. (2014). Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. *Nature Biotechnology*, 32(7), 656- 662. <https://doi.org/10.1038/nbt.2906>

Wu, G., Terol, J., Ibanez, V., López-García, A., Pérez-Román, E., Borredá, C., ... Talon, M. (2018). Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature*, 554(7692), 311- 316. <https://doi.org/10.1038/nature25447>

Wu, H., Acanda, Y., Jia, H., Wang, N., & Zale, J. (2016). Biolistic transformation of Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. × *Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Plant Cell Reports*, 35(9), 1955- 1962. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2010-2>

Xing, H.-L., Dong, L., Wang, Z.-P., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Liu, B., ... Chen, Q.-J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, 14(1), 327.

Xu, Q., Chen, L.-L., Ruan, X., Chen, D., Zhu, A., Chen, C., ... Ruan, Y. (2013). The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nature Genetics*, 45(1), 59- 66. <https://doi.org/10.1038/ng.2472>

Xu, T., Li, Y., Shi, Z., Hemme, C. L., Li, Y., Zhu, Y., ... Zhou, J. (2015). Efficient Genome Editing in

*Clostridium cellulolyticum* via CRISPR-Cas9 Nickase. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(13), 4423- 4431. <https://doi.org/10.1128/AEM.00873-15>

Yu, J., Wang, L., Walzem, R. L., Miller, E. G., Pike, L. M., & Patil, B. S. (2005). Antioxidant Activity of Citrus Limonoids, Flavonoids, and Coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2009- 2014. <https://doi.org/10.1021/jf0484632>

Zhang, F., LeBlanc, C., Irish, V. F., & Jacob, Y. (2017). Rapid and efficient CRISPR/Cas9 gene editing in Citrus using the YAO promoter. *Plant Cell Reports*, 36(12), 1883- 1887. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2202-4>

Zou, X., Li, D., Luo, X., Luo, K., & Pei, Y. (2008). An improved procedure for Agrobacterium-mediated transformation of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) via indirect organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 44(3), 169- 177. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9106-5>



# **Annexes**



## Annexes

## Annexe 1. Médicaments montrant une interaction avec le jus de pomelo de Bailey, Dresser, et Arnold 2013

| Interacting Drugs               | Innate Oral Bioavailability <sup>†</sup> | Dose-Related Drug Adverse Event(s) | Predicted Interaction Risk Rank ** | Potential Alternative Medication(s)*** |
|---------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|--|
| <b>Anti-Cancer Agents</b>       |  |                                    |                                    |  |
| crizotinib                      | intermediate                             | torsade de pointes, myelotoxicity  | high                               |  |
| cyclophosphamide                | high                                     | loss of efficacy                   | intermediate                       |  |
| dasatinib                       | not known                                | torsade de pointes, myelotoxicity  | high                               | imatinib                               |
| erlotinib                       | intermediate                             | myelotoxicity                      | high                               |  |
| everolimus                      | low                                      | myelotoxicity, nephrotoxicity      | high                               |  |
| imatinib                        | high                                     | myelotoxicity                      | intermediate                       |  |
| lapatinib                       | incomplete                               | torsade de pointes, myelotoxicity  | high                               |  |
| nilotinib                       | intermediate                             | torsade de pointes, myelotoxicity  | high                               | imatinib                               |
| pazopanib                       | incomplete                               | torsade de pointes, myelotoxicity  | high                               | sorafenib                              |
| sorafenib                       | intermediate                             | myelotoxicity                      | intermediate                       |  |
| sunitinib                       | not known                                | torsade de pointes, myelotoxicity  | high                               | sorafenib                              |
| vandetanib                      | not known                                | torsade de pointes, myelotoxicity  | high                               |  |
| venurafenib                     | not known                                | torsade de pointes, myelotoxicity  | high                               |  |
| <b>Anti-Diabetic Agents</b>     |  |                                    |                                    |  |
| repaglinide                     | intermediate                             | hypoglycemia                       | intermediate                       | glyburide, metformin, sitagliptin      |
| saxagliptin                     | intermediate                             | hypoglycemia                       | intermediate                       | glyburide, metformin, sitagliptin      |
| <b>Anti-infective Agents</b>    |  |                                    |                                    |  |
| albendazole                     | low                                      | dizziness, headache, nausea        | intermediate                       |  |
| artemether                      | low                                      | enhanced anti-malarial efficacy    | low                                |  |
| erythromycin                    | intermediate                             | torsade de pointes                 | high                               | clarithromycin                         |
| etravirine                      | not known                                | skin rash                          | low                                |  |
| halofantrine                    | low                                      | torsade de pointes                 | very high                          | doxycycline                            |
| maraviroc                       | low                                      | postural hypotension, syncope      | very high                          | enfuvirtide                            |
| praziquantel                    | low                                      | dizziness, headache, somnolence    | intermediate                       |  |
| primaquine                      | intermediate                             | myelotoxicity                      | high                               | doxycycline                            |
| quinine                         | intermediate                             | torsade de pointes                 | high                               | doxycycline                            |
| <b>Anti-Lipemic Agents</b>      |  |                                    |                                    |  |
| ritonavir                       | not known                                | torsade de pointes                 | high                               | nevirapine                             |
| saquevir                        | very low                                 | enhanced HIV efficacy              | low                                | amprenavir, indinavir                  |
| <b>Anti-Inflammatory Agents</b> |  |                                    |                                    |  |
| budesonide – oral               | intermediate                             | hyperglycemia, Cushingoid features | intermediate                       |  |
| colchicine                      | not known                                | neutropenia, neuropathy            | intermediate                       | prednisone, ibuprofen                  |
| methylprednisolone -oral        | intermediate                             | hyperglycemia, Cushingoid features | intermediate                       | prednisone                             |
| <b>Anti-Lipemic Agents</b>      |  |                                    |                                    |  |
| atorvastatin                    | low                                      | rhabdomyolysis                     | high                               | pravastatin, rosuvastatin, fluvastatin |
| lovastatin                      | very low                                 | rhabdomyolysis                     | very high                          | pravastatin, rosuvastatin, fluvastatin |
| simvastatin                     | very low                                 | rhabdomyolysis                     | very high                          | pravastatin, rosuvastatin, fluvastatin |
| <b>Cardiovascular Agents</b>    |  |                                    |                                    |  |
| amiodarone                      | intermediate                             | torsade de pointes                 | high                               | sotalol                                |
| amlodipine                      | high                                     | hypotension, peripheral edema      | low                                |  |
| apixaban                        | intermediate                             | GI bleeding                        | high                               | warfarin                               |
| cilostazol                      | not known                                | GI bleeding                        | high                               | acetylsalicylic acid                   |
| clopidogrel                     | very low                                 | loss of efficacy                   | high                               | acetylsalicylic acid                   |
| dronedarone                     | low                                      | torsade de pointes                 | very high                          | sotalol                                |
| eprenone                        | intermediate                             | hyperkalemia, serious arrhythmias  | high                               | spironolactone                         |
| ergotamine                      | very low                                 | gangrene, stroke                   | very high                          | a triptan class drug                   |
| felodipine                      | low                                      | hypotension, peripheral edema      | intermediate                       | amlodipine                             |
| losartan                        | intermediate                             | loss of efficacy                   | intermediate                       |  |
| manidipine                      | low                                      | hypotension, peripheral edema      | intermediate                       | amlodipine                             |
| nicardipine                     | low                                      | hypotension, peripheral edema      | intermediate                       | amlodipine                             |
| nifedipine                      | intermediate                             | hypotension, peripheral edema      | intermediate                       | amlodipine                             |
| nimodipine                      | very low                                 | hypotension, peripheral edema      | intermediate                       |  |
| nisoldipine                     | very low                                 | hypotension, peripheral edema      | intermediate                       | amlodipine                             |
| nitrendipine                    | low                                      | hypotension, peripheral edema      | intermediate                       | amlodipine                             |
| propafenone                     | low                                      | bradycardia, conduction disorders  | intermediate                       |  |
| quinidine                       | high                                     | torsade de pointes                 | intermediate                       |  |

Appendix 1: Bailey DG, Dresser G, Arnold JMA. Grapefruit and medication interactions: forbidden fruit or avoidable consequences? CMAJ 2012; DOI:10.1503/cmaj.120251. Copyright © 2012 Canadian Medical Association or its licensors

|                                 |              |  |              |                                      |
|---------------------------------|--------------|--|--------------|--------------------------------------|
| rivaroxaban                     | high         | GI bleeding  | intermediate | warfarin                             |
| sibutramine                     | not known    | hypertension   | intermediate |                                      |
| sildenafil                      | intermediate | hypotension  | intermediate |                                      |
| tadalafil                       | intermediate | hypotension  | intermediate |                                      |
| ticagrelor                      | intermediate | GI or kidney bleeding                                | high         | acetylsalicylic acid                 |
| ildenafil                       | intermediate | hypotension  | intermediate |                                      |
| verapamil                       | intermediate | complete heart block                                 | high         | diltiazem                            |
| <b>CNS Agents</b>               |              |  |              |                                      |
| aprepitant                      | intermediate | drowsiness, headache                                 | low          |                                      |
| alfentanil – oral               | intermediate | respiratory depression                               | high         | hydromorphone, morphine              |
| buspirone                       | very low     | dizziness, sedation                                  | high         | oxazepam, temazepam                  |
| carbamazepine                   | high         | ataxia   | low          | phenytoin, clobazepam                |
| dextromethorphan                | very low     | hallucinations, somnolence                           | high         |                                      |
| diazepam                        | low          | sedation   | intermediate | alprazolam, oxazepam, temazepam      |
| fentanyl – oral                 | intermediate | respiratory depression                               | high         | hydromorphone, morphine              |
| fluvoxamine                     | not known    | adverse change in mood                               | intermediate | citalopram, paroxetine, escitalopram |
| ketamine – oral                 | low          | respiratory depression                               | very high    | hydromorphone, morphine              |
| lurasidone                      | low          | torsade de pointes, orthostatic hypotension, syncope | very high    | haloperidol, risperidone, olanzapine |
| methadone                       | high         | respiratory depression                               | intermediate |                                      |
| midazolam – oral                | intermediate | sedation   | intermediate | alprazolam, lorazepam                |
| oxycodone                       | intermediate | respiratory depression                               | high         | hydromorphone, morphine              |
| pimozide                        | intermediate | torsade de pointes                                   | high         | haloperidol, risperidone, olanzapine |
| quazepam                        | intermediate | sedation   | low          | alprazolam, oxazepam, temazepam      |
| quetiapine                      | very low     | dizziness, somnolence                                | high         | haloperidol, risperidone, olanzapine |
| sertraline                      | intermediate | dizziness, somnolence                                | intermediate | citalopram, paroxetine, escitalopram |
| triazolam                       | intermediate | sedation   | intermediate | alprazolam, lorazepam                |
| ziprasidone                     | intermediate | torsade de pointes                                   | high         | haloperidol, risperidone             |
|                                 |              |  |              | olanzapine                           |
| <b>Estrogens</b>                |              |  |              |                                      |
| estradiol                       | low          | breast cancer risk, thrombosis                       | intermediate |                                      |
| ethinylestradiol                | intermediate | breast cancer risk, thrombosis                       | intermediate |                                      |
| <b>Gastrointestinal Agents</b>  |              |  |              |                                      |
| cisapride                       | intermediate | torsade de pointes                                   | high         | metoclopramide                       |
| domperidone                     | low          | torsade de pointes                                   | very high    | metoclopramide                       |
| <b>Immunosuppressant Agents</b> |              |  |              |                                      |
| cyclosporine                    | low          | nephrotoxicity                                       | high         |                                      |
| everolimus                      | low          | myelotoxicity, nephrotoxicity                        | high         |                                      |
| sirolimus                       | low          | myelotoxicity, nephrotoxicity                        | high         |                                      |
| tacrolimus                      | low          | nephrotoxicity                                       | high         |                                      |
| <b>Urinary Tract Agents</b>     |              |  |              |                                      |
| darifenacin                     | low          | urinary retention, constipation                      | intermediate |                                      |
| fesoterodine                    | intermediate | urinary retention, constipation                      | intermediate |                                      |
| solifenacin                     | high         | torsade de pointes                                   | intermediate |                                      |
| silodosin                       | intermediate | postural hypotension, dizziness                      | intermediate |                                      |
| tamsulosin                      | intermediate | postural hypotension, dizziness                      | intermediate |                                      |

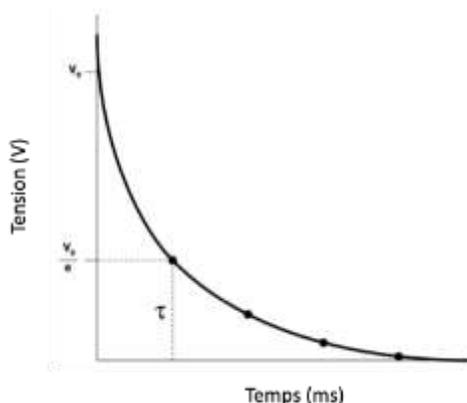
\* Innote oral drug bioavailability is the population average: very low (<10%), low (>10-30%), intermediate (>30 – 70%), high (>70%)

\*\* Predicted Risk Rank is based initially upon the seriousness of the dose-related adverse drug effect and then adjusted dependent upon the innate oral bioavailability of the drug, which is used to determine the potential magnitude of increase in systemic drug concentration (see text). There are four categories of risk ranking: very high, high, intermediate, low. It is recommended for older patients, particularly the elderly, that drugs in the very high or high category that consumption of grapefruit or other interacting citrus fruits should be contraindicated during pharmacotherapy until proven safe or that a suggested alternative non-interacting drug be employed when available.

\*\*\* Potential alternative medication(s) include established or predicted (italics) commonly prescribed drugs (Top 100 prescribed in 2011 in Canada) with the same therapeutic indication that have no or minor pharmacokinetic interaction with grapefruit or other interacting citrus fruits.

## Annexe 2. Mise au point et calculs de l'électroporation des protoplastes

Avant de transformer les protoplastes avec les constructions plasmidiques permettant d'exprimer Cas9 et les sgRNA ciblant *gfpt1*, il a été d'abord mis au point une méthode de transformation par électroporation. Nous nous sommes basés sur le travail de Niedz *et al* (2003) sur l'électroporation de protoplastes de *C. sinensis*. L'électroporation consiste à appliquer un choc électrique par décharge d'un condensateur (décroissance exponentielle) aux cellules en solution avec une résistance spécifique (**R**).



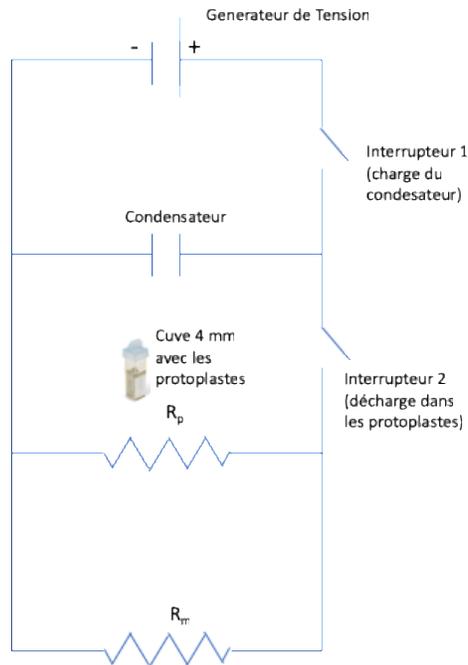
**Figure annexe 1. Décroissance exponentielle d'un choc électrique par décharge d'un condensateur. Quand le condensateur, chargé à une tension initiale,  $V_0$  est déchargé vers les cellules, la tension appliquée sur les cellules diminue dans le temps. Donc à  $t = \tau$  la tension appliquée est  $V_0/e$  de la valeur initiale.**

Les calculs d'électroporation de Niedz *et al.* ont été vérifiés pour mieux comprendre leurs résultats et les répéter. Les deux paramètres importants pour cette expérience sont 1), le temps caractéristique  $\tau$ , qui détermine le temps durant lequel la plus grande partie de l'énergie sera délivrée à la solution et 2), le champ électrique **E** appliqué à cette solution (Figure annexe 1). Ce champ électrique peut être déterminé car nous connaissons la tension initiale  $V_0$  appliquée et la largeur de la cuve d'électroporation **d** avec la formule  $E = V_0/d$ . Selon Niedz le **E** optimal se trouve entre 375 et 450 V cm<sup>-1</sup>. Comme les cuves d'électroporation étaient de **d** = 4 mm la tension à tester a donc été fixée entre 150 et 180 V.

En ce qui concerne le temps caractéristique  $\tau$ , ils ont montré que la capacité (C) de l'électroporateur doit être fixée à 960  $\mu$ F, pour l'électroporation d'une solution saline « CPW » contenant 0,7 mM de Mannitol, 10 mM d'HEPES pH= 8,0 et contenant  $1 \times 10^6$  protoplastes mL<sup>-1</sup>. Cette solution présente une résistance  $R_p = 386 \Omega$ . En utilisant la formule du temps caractéristique ( $\tau$ ) «  $\tau = R_p \cdot C$  », nous obtenons  $\tau = 366$  ms, ce qui dépasse largement le  $\tau$  optimale trouvé par les auteurs de 70 à 80 ms. Ce paramètre peut affecter

l'efficacité de transformation car la durée du choc électrique sera beaucoup plus longue. Afin que  $\tau$  soit bien entre 70 et 80 ms, la résistance totale ( $R_{eq}$ ) doit être entre 73 et 85  $\Omega$ .

Il est donc nécessaire de réduire la résistance totale de la solution de protoplastes sans modifier sa composition. Pour cela, il est courant d'ajouter une résistance en parallèle ( $R_m$ ) programmable sur un module de l'électroporateur (Figure ci-dessous).



**Figure annexe 2. Schéma équivalent du montage électroporation. La résistance  $R_p$  est la résistance de la solution de protoplastes en solution dans une cuve de 4 mm.  $R_m$  est une résistance variable qui permet plus de flexibilité à l'appareil pour atteindre le  $\tau$  souhaité. La valeur de  $R_m$  n'est pas mentionnée sur la publication de Niedz, elle a donc été calculée en l'isolant de l'équation suivante :**

$$R_{eq} = \frac{R_p \cdot R_m}{R_p + R_m}$$

...

$$R_m = \frac{1}{\frac{1}{R_{eq}} - \frac{1}{R_p}}$$

En substituant les valeurs connues de  $R_{eq}$  (73 et 85  $\Omega$ ) et  $R_p$  (386  $\Omega$ ) on obtient que  $R_m$ , c'est-à-dire, la résistance du module de l'électroporateur, doit être programmée entre 91 et 109

$\Omega$ . L'électroporateur utilisé dans le laboratoire (Gene Pulser Xcell, Bio Rad) permet de programmer  $R_m$  égal à  $100 \Omega$  et  $C=950 \mu\text{F}$ , valeurs suffisamment proches de celles de Niedz *et al.* pour reproduire leur temps caractéristique, comme il est montré ci-dessous :

$$R_{eq} = \frac{R_p \cdot R_m}{R_p + R_m}$$

$$R_{eq} = \frac{386 \Omega \cdot 100 \Omega}{386 \Omega + 100 \Omega}$$

$$R_{eq} = 79.42 \Omega$$

Et donc :

$$\tau = R_{eq} \cdot C$$

$$\tau = 79.42 \Omega \cdot 950 \mu\text{F}$$

$$\tau = 75.45 \text{ ms}$$

Le protocole de Niedz *et al.* a donc été adapté aux protoplastes de pomelo Star Ruby. Dans un premier temps, des expériences préliminaires d'électroporation ont été réalisées avec le vecteur pBin-GFP avec les paramètres de capacité, résistance et tension déjà décrits. En revanche, l'efficacité de transformation ne pouvait pas être mesurée car il y avait très peu des cellules présentant de la fluorescence 24 h après l'électroporation. Cependant, ces premières expériences ont servi à établir une limite minimale de concentration et de volume de vecteur à ajouter lors de l'électroporation : si le vecteur ajouté était à une inférieure à  $5 \mu\text{g}$  et que cela excédait  $10 \mu\text{L}$ , il n'y avait aucun protoplaste fluorescent 24 h après l'électroporation. En effet, le changement du volume total de la solution de transformation change la résistance  $R_p$  et donc  $\tau$ .

D'un autre côté, travailler avec le vecteur pBin-GFP a présenté deux grandes difficultés : 1) étant un vecteur « *low copy* » il est difficile d'en produire de grandes quantités nécessaires pour la transformation (selon Niedz, il faut  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  pour une transformation optimale) ; 2) les protoplastes présentent une faible fluorescence verte naturelle, qui peut être assimilée à des faux positifs. Pour la mise au point de l'électroporation, nous avons donc décidé de changer de gène rapporteur. Le vecteur pCAS9-DsRed, décrit en matériel et méthodes.

Selon le protocole de Niedz, l'efficacité de la transformation peut être améliorée s'ils ajoutent  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  d'ADN de sperme de saumon et avec un choc thermique à  $45^{\circ}\text{C}$  pendant 5 min.

### Annexe 3. Amorces de *gfpt1*

Amorce GfPT1 directe

ATGAGTCCTCTCATGCATTTACATTCAGGC

Amorce GfPT1 reverse

TCATAATCGTACAAATGGAATAATGAGGCATTCAACATAG

Amorce 3R

5'-GTGCCCGGATTGCTGATGAC-3'

Amorce 5R

5'-CGTAATAGCGACTGCAAACATCAATG-3'

Amorce de séquençage

5'-CAAAGGTCAACAAGCCTAATCTCC-3'

Amorce GfPT1-F pour qPCR

5'-AAACGCTTGAATCGCCACTAG-3'

Amorce GfPT1-R pour qPCR

5'-GGACTTCGGGAGCATTTCAC-3'

Amorce EF1-F pour qPCR

5'-TGGTGATGCTGGGTTTGTTA-3'

Amorce EF1-R pour qPCR

5'-CACGCTCTTGATGACTCAA-3'

## Annexe 4. Matrices d'identité des séquences candidates

| Seq      | Cit1 | Cit2 | Cit3 | Cit4 | Cit5 | Cit6  | Cit7 | Cit8 | Cit9 | Cit10 | Cit11 | Cit12 | CYP82D64 | CYP82C2 | CYP82C4 |
|----------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|-------|-------|-------|----------|---------|---------|
| Cit1     | ID   | 0.82 | 0.74 | 0.54 | 0.54 | 0.59  | 0.56 | 0.54 | 0.56 | 0.55  | 0.51  | 0.55  | 0.56     | 0.58    | 0.58    |
| Cit2     | 0.80 | ID   | 0.88 | 0.64 | 0.63 | 0.711 | 0.65 | 0.63 | 0.66 | 0.64  | 0.61  | 0.64  | 0.66     | 0.69    | 0.69    |
| Cit3     | 0.66 | 0.80 | ID   | 0.64 | 0.65 | 0.711 | 0.64 | 0.63 | 0.65 | 0.692 | 0.61  | 0.64  | 0.65     | 0.69    | 0.69    |
| Cit4     | 0.41 | 0.46 | 0.47 | ID   | 0.91 | 0.67  | 0.77 | 0.91 | 0.65 | 0.91  | 0.70  | 0.93  | 0.73     | 0.62    | 0.64    |
| Cit5     | 0.42 | 0.47 | 0.50 | 0.85 | ID   | 0.65  | 0.76 | 0.89 | 0.64 | 0.97  | 0.69  | 0.91  | 0.72     | 0.61    | 0.63    |
| Cit6     | 0.46 | 0.55 | 0.57 | 0.50 | 0.51 | ID    | 0.65 | 0.65 | 0.70 | 0.65  | 0.63  | 0.66  | 0.72     | 0.78    | 0.79    |
| Cit7     | 0.40 | 0.46 | 0.48 | 0.67 | 0.65 | 0.50  | ID   | 0.75 | 0.64 | 0.76  | 0.66  | 0.77  | 0.72     | 0.62    | 0.62    |
| Cit8     | 0.41 | 0.46 | 0.47 | 0.85 | 0.82 | 0.49  | 0.64 | ID   | 0.64 | 0.89  | 0.68  | 0.92  | 0.72     | 0.61    | 0.62    |
| Cit9     | 0.43 | 0.50 | 0.50 | 0.48 | 0.48 | 0.54  | 0.48 | 0.48 | ID   | 0.63  | 0.60  | 0.65  | 0.64     | 0.68    | 0.67    |
| Cit10    | 0.42 | 0.47 | 0.48 | 0.85 | 0.81 | 0.51  | 0.65 | 0.81 | 0.47 | ID    | 0.69  | 0.90  | 0.72     | 0.62    | 0.62    |
| Cit11    | 0.37 | 0.43 | 0.44 | 0.57 | 0.56 | 0.49  | 0.52 | 0.55 | 0.44 | 0.56  | ID    | 0.70  | 0.66     | 0.58    | 0.60    |
| Cit12    | 0.41 | 0.46 | 0.48 | 0.87 | 0.83 | 0.50  | 0.65 | 0.85 | 0.48 | 0.82  | 0.55  | ID    | 0.72     | 0.62    | 0.63    |
| CYP82D64 | 0.43 | 0.49 | 0.50 | 0.60 | 0.59 | 0.60  | 0.61 | 0.59 | 0.48 | 0.60  | 0.52  | 0.59  | ID       | 0.68    | 0.68    |
| CYP82C2  | 0.41 | 0.47 | 0.51 | 0.45 | 0.45 | 0.66  | 0.45 | 0.44 | 0.49 | 0.45  | 0.43  | 0.45  | 0.51     | ID      | 0.94    |
| CYP82C4  | 0.42 | 0.49 | 0.52 | 0.46 | 0.47 | 0.67  | 0.47 | 0.45 | 0.48 | 0.45  | 0.44  | 0.46  | 0.52     | 0.88    | ID      |

Figure annexe 3. Matrice d'identité (orange) et de similarité (bleu) des séquences peptidiques des gènes candidats et des CYP82D64, CYP82C2 et CYP82C4. La matrice a été générée avec l'algorithme BLOSUM65 en comparant les séquences préalablement alignées avec ClustalW dans le logiciel Bioedit. Les séquences 1 à 8 ont été sélectionnées par homologie de séquence + la séquence décrite par Dugrand. Les séquences 9 à 12 ont été identifiées à partir de données transcriptionnelles.

| Seq                   | Cit13 | Cit14 | Cit15 | Cit16 | Cit17 | Cit18 | CYP71A3 | CYP71A4 | CYP71A23 | CYP71A24 | CYP71A26 | orange1.<br>1g048790m | Ciclev<br>10018132m |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|----------|----------|----------|-----------------------|---------------------|
| Cit13                 | ID    | 79    | 77    | 62    | 57    | 50    | 63      | 62      | 56       | 56       | 56       | 62                    | 78                  |
| Cit14                 | 66    | ID    | 74    | 63    | 56    | 52    | 63      | 62      | 56       | 56       | 56       | 61                    | 87                  |
| Cit15                 | 71    | 62    | ID    | 60    | 58    | 46    | 61      | 59      | 53       | 54       | 53       | 60                    | 74                  |
| Cit16                 | 44    | 43    | 42    | ID    | 79    | 53    | 61      | 59      | 53       | 54       | 53       | 83                    | 67                  |
| Cit17                 | 39    | 39    | 40    | 69    | ID    | 47    | 58      | 58      | 55       | 56       | 55       | 85                    | 59                  |
| Cit18                 | 32    | 34    | 29    | 34    | 32    | ID    | 52      | 54      | 52       | 52       | 56       | 51                    | 53                  |
| CYP71A3               | 43    | 44    | 42    | 48    | 41    | 31    | ID      | 82      | 58       | 56       | 56       | 43                    | 45                  |
| CYP71A4               | 42    | 43    | 40    | 44    | 39    | 34    | 69      | ID      | 59       | 59       | 56       | 42                    | 45                  |
| CYP71A23              | 37    | 37    | 36    | 39    | 40    | 32    | 35      | 38      | ID       | 56       | 59       | 42                    | 45                  |
| CYP71A24              | 37    | 37    | 36    | 41    | 37    | 33    | 35      | 37      | 73       | ID       | 91       | 39                    | 37                  |
| CYP71A26              | 37    | 37    | 36    | 41    | 38    | 31    | 37      | 38      | 84       | 74       | ID       | 41                    | 38                  |
| orange1.<br>1g048790m | 43    | 42    | 42    | 73    | 85    | 35    | 63      | 61      | 60       | 59       | 59       | ID                    | 64                  |
| Ciclev<br>10018132m   | 63    | 75    | 59    | 46    | 41    | 33    | 65      | 64      | 58       | 57       | 58       | 45                    | ID                  |

Figure annexe 4. Matrice d'identité (orange) et de similarité (bleu) des séquences peptidiques des gènes candidats et des CYP82D64, CYP82C2 et CYP82C4. La matrice a été générée avec l'algorithme BLOSUM65 en comparant les séquences préalablement alignées avec ClustalW dans le logiciel Bioedit.

## Annexe 5. Amorces des gènes candidats

| Gène candidat | Amorce directe                  | Archivage LAE | Amorce reverse                                    | Archivage LAE |
|---------------|---------------------------------|---------------|---|---------------|
| Cit1          | ATGGGATTCTCCCATCACCTG           | 1376          | tcaATGATGATGATGATGATGAGTTGAATGCATGGAGTAGGCG       | 1377          |
| Cit2          | ATGGGATTCTCCCTTCATCTGC          | 1380          | tcaATGATGATGATGATGATGAATAACATTGGAAGGCACCCGTG      | 1381          |
| Cit3          | ATGGAATTCTCCCTTCAGCTTCAAG       | 1382          | tcaATGATGATGATGATGATGAACATATAGCTTGGAAAGGCAGTCTTG  | 1383          |
| Cit4          | ATGGACATTCTTGGTTCTGCTCAAC       | 1384          | tcaATGATGATGATGATGATGGCCGTACAAGAAGCAGAAAGAC       | 1385          |
| Cit5          | ATGGACTTCTTGTGTTTAAACATCTCAAC   | 1386          | tcaATGATGATGATGATGATGGCCATACAGAGAAGCAGAGAG        | 1387          |
| Cit6          | ATGAAGGACTCGATTACTTGTGTTG       | 1388          | tcaATGATGATGATGATGATGAAATCCATAGGGGTTGGGAGG        | 1389          |
| Cit6-Bis      | ATGAAGGACTCGATTACTTGTGTTGATGACC | 1581          | TCAATGATGATGATGATGATGAAATCCATAGGGGTTGGGAGGGAG     | 1582          |
| Cit7          | ATGGCCTTTTTGCATCCAAACAAG        | 1390          | tcaATGATGATGATGATGATGGCCATATAGCGATGCGGAAAG        | 1391          |
| Cit8          | ATGTTAGCAGGTACAGCAGCC           | 1398          | tcaATGATGATGATGATGATGGCCGTACAAGAAGCAGAAAGAC       | 1399          |
| Cit9          | ATGAATTCCTTCTCCCATATCTAGACACC   | 1579          | ttaGTGATGGTGATGGTGATGTTTCATAGAGATTAGAAGGCAAACGCGG | 1570          |
| Cit10         | ATGGGCATTCTTGTTCATCTCAAC        | 1662          | tcaATGATGATGATGATGATGGCTGTAGAAGGCAGCAGAAAG        | 1663          |
| Cit11         | ATGGCTGACAAATATGGACCAATATTC     | 1664          | tcaATGATGATGATGATGATGACCATATGAAGAGGCAGAAAGGC      | 1665          |
| Cit12         | ATGGACTTCTTGTTCACGTCAAC         | 1666          | tcaATGATGATGATGATGATGGCCGTACAAGAAGCAGAAAG         | 1667          |
| Cit13         | ATGGCTCTGGTATCAGTCCTG           | 1366          | tcaATGATGATGATGATGATGAGAGCAAGGGGAGTAGAGCG         | 1367          |
| Cit14         | ATGGCTCTGCCATCAATCTTAAAG        | 1368          | tcaATGATGATGATGATGATGTACAGGTACAGGGGAATATAAAGTTG   | 1369          |
| Cit15         | ATGGCTCTGCTATCAGTCCTG           | 1370          | tcaATGATGATGATGATGATGAGGGTAAGGGGAGTAAAGTGTG       | 1371          |
| Cit16         | ATGACTTCTCAATTTTTCTTGATGCTC     | 1372          | tcaATGATGATGATGATGATGTGTGCGATGTGTAGGCTGTGG        | 1373          |
| Cit17         | ATGATTTCTCAATTTTTCTTCTTCTTG     | 1374          | tcaATGATGATGATGATGATGCGAGTAAATTCGCAAGGGCAAGC      | 1375          |
| Cit18         | ATGTTTTCGGTTATCAACATGTTCCG      | 1767          | tcaATGATGATGATGATGATGTGAAATGGATAATCTTGCAGTTGG     | 1768          |

## Annexe 6. Séquences nucléotidiques des gènes candidats clonés

### **CYP82C49 (Cit1)**

ATGGGATTCTCCCATCACCTGCAAGAAATCGTAGCCTTTTGTGCTCTTATTTTTTCAATT  
ATCTGTGTCTATGCGGCTACAAGCAATGCCAAAAGGAACAAGAAAGGAGGCAGGAAGCCA  
CCAGAAGCGGCAGGGGCATGGCCTTGTGTCGGTACCTCCATCTCCTGGCAGGATCAAAT  
CAGCTAATACATCAAACACTTGGGGAAATGGCTGATAAGTATGGAAAAGCCTTCTTGATC  
CACCTTGAATTCATCGAGCACTTGTGATTAGCAGCTGGGAAGTGACAAAAGAATGTTTC  
ACCACCAATGACAAGCTCTTCTCCACACGTCCAAAATCCTTAGCTGTGAAGCTTATGGGT  
TATGACCATGCCATGATTGGCTTTGTCCTTACGGATCATATTGGCGAGAAGTTAGAAAA  
CTTTCCACAGTCCAACCTTCTCAAATCATCGGCTTGAGTTGCTCAAGCATGTTTCGTGAC  
ACTGAAGTCAAAGTCTTTATCCAAGAGCTACACGAACAATGTGCCAAAATGGGGGTCAT  
GTTGCTGTTGAGATGAAGGAAAGGTTTAAGGACTTGGCAATGAATATTATAGTCAGAATG  
ATTGCTGGTAAAAGATATTATGGTAGTGAAACCAATGCTGATGATCAGGAATCAAAAAGA  
TTTCAGAAAGGCCTTGGGTGATTTCTTATATCTATTAGGGCTATTCTTAGCCTCAGATAAC  
ATTCCATTTCTGGTTGGTTGGATATTGTAAGGGATACACAGGTCAAATGAAGAGAACA  
GCAAAGGAGTTGGATGATGTGTTTGGTAGGCTGGTCAAGAGCATCGTCATAAGAGGCTC  
AACGGGAGCATCAACAAGGATGAGGAAGACTTCATTGATGTCATGCTGTCTGTCATGGAT  
GATGGCAAGACTTCTCCTGAGGATGCCGATACTGTCATTAAGGCCACGTGCTTGAGCCTA  
ATATCAGGTGGCAATGATACCACAGTGACCACAATTACATGGGCACTATCTCTTCTATTG  
AACAACCGGCATGTACTAAAAAAGGCACAAGATGAGCTCGACATCCATGTTGGAAAGAAT  
CGGCAAGTTGAGGAATCTGATATTAAGAACCTGCTATACTTACAAGCAATTGTCAAAGAA  
ACATTAAGATTATGCCCTCCGCTACCGCTTTCAGCTCCACGTGAGGCCATGGAGGATTGC  
ACCATTGATGGCTTCCACATCCCAGCAGGCACACGGCTTATAGTTAACTTGTGGAAGATG  
CATCGTGATCCCAGCATTTGGGCAAACCCGTCAGAATTTATACCTGATAGATTCTAAAT  
GAAAATGCCAAGTTGGATGTTAATGGTCAGGATTTTGAATTTTTACCATTTGGCTCTGGT  
AGAAGGAAGTGTCCAGGGATCTCATTGCTCTTCAGGTTCAGCACTTGACATTGGCACGC  
CTACTCCATGCATTCAACTTAGAG

### **CYP82C46 (Cit3)**

ATGGAATTCTCCCTTCAGCTTCAAGCAATCATATGCTTCTGTGCGCTTCTTGCTGCTATTATCTGCCT  
CTATGTGGCTACAAACACTACCAATAGGAACAGAAAGAGAGGCAGCAGGCCACCAGAGCCGGAG  
GGAGCATGGCCTTTTATCGGTCACCTTCATCTCCTCGAAAAGAACCAGCTGCTACATCAAACACTT  
GGGAAGATGGCTGACAAGTATGGAAAAGCCTTCATGATCCGCCTTGAATTCGTCAAGCGCTAGT  
GATTAGCAGCTGGGAAGTGGCAAAGAATGTTTCACCACCAATGACAAGCTCTTCTCCTCACGTCC  
AAAATTCTTAGCAGTGAAGCTCATGGGTTATGACCATGCCATGCTGGGCTTTGCTCCTTACGGACC  
ATATTGGCGCAATATTAGGAAATTAGCCACGGTTGAGCTTCTCTCAAATCATCAGCTTGAGCTGAT  
CAAGCATGTTTCGTGACATTGAAACCAAAATTTTCAATTAAGGAGTTGTACGAACCTATGTGTGAAAA  
TGGAGGCCTTGTGACGTGGAGATGAAGGAAAGGTTTGGGGACTTGGCAATGAACATTATATTG  
AGAGTGATTGCTGGTAAAAGATTTTTTGGCCGTGACACAAATGCTGATGATCAGGATTCAAGACA  
ATGCCAGAAGGCTTTGGGCAATTTCTTTTACCTAGTAGGGTTACTTTTGCCTCGGATAACATTCCA  
TTTCTTGGTTGGTTAGATGTTGTGAACGGATATACAGGTCAAATGAAGAAAACAGCTAAGGAGTT  
GGACACTCTGTTTGGTAGGTTGGTGCACGAGCATCGTCATAAGAGACTCAACGAGAGCATCAAGG  
AAGAGGAGAAAGACCTCATTGATGTCATGGTGTCTGTTCTGGATGATGGTAAGACTTCTGCTGAG

GATGCCGATACTGTCATTAAGTCCACTTGCTTGAGCCTTATATTAGGAGGCAATGACACTACAGTG  
 GTCACTCTTACATGGGCACTGTCTCTACTATTGAACAATCACCATGTGCTGAAAAAAGCACAAAGAT  
 GAGCTCAGTATCCATGCTGGAAACAATCGGCAAGTTGAGGAATCTGATATAAAGAACCTGATATA  
 CTTGCAAGCAATTGTCAAAGAAACATTGAGATTATACCCTGCACTTCCACTTTTCAGCTCCACGTGA  
 GGCCATGGAGGATTGCATCATTGGAGGCTTCCACATCCCAGCAGGCACACGACTTATAGTAACTT  
 GTGGAAGATGCATCGTGATCCCAGCATATGGGCAAACCTTCAGAATTTATACCTGAGAGGTTCCCT  
 AAATGAAAATGCCAATTTGGAAGTCAAGGGTCAGGATTTTGAATTTTACCATTTGGTTCTGGTAG  
 AAGGAAGTGTCCAGGAATCTCATTGCTCTTCAAGTACTGCACTTGACCTTAGCACGCCTGCTTCA  
 TGCATTGAGTTAGGGACAGTTTCAGACACATTAGTTGACATGCGTGAAAGCCCTGGGATGACTG  
 TTCCTAAAGCAACAGCACTGGAGGTTACCCTTACCCAAGACTGCCTTCCAAGCTATATGTT

#### **CYP82D83 (Cit4)**

ATGGACATTCTTGGTTCGTCTCAAACAAGTACTGTGCGCAGCAATTTTAATCACTCTTTTAATCATTCT  
 ATACACCTCGTTGTCAGTTTCAAGAAATTTGCTTAGAAAATACACAAGCAAGAAGAAGAGGGGGAG  
 CACCAGAAGCTGGGGGAGCATGGCCTGTGATTGGCCATCTACACCTCTTAGGAGGGCCAGAACCT  
 CCTCACAGGGTGTGGGCTGCATGGCTGACAAGTATGGACCAATCTTACAATCAAGATGGGCAT  
 AAATCGAGCATTAGTTGTGAGTAATTGGGAGATGGCTAAAGAGTGTCTTACTACACACGACAAAG  
 TCTTTGCCAGCCGTCCAAAACCTTAGCCATGGAGATTTTAGGCTACAATTTTTCCATGTTTGGGTT  
 TAGCCCATACGGCTCTTACTGGCGAGAGACACGCAAGATAGCCACACTTGAGCTTCTCTCGAACCA  
 TCGGCTTGAGAAGCTGAAGCATGTACGAGAGTACGAGTTGAAGACTTGTTTTAAGGAGTTATAACC  
 AGTTATGGGACAACAACAAAAGCACTAATAAGATGTTGTTGGTAGAGATGAAGAGATGGCTTGC  
 AGACAGCATCCGTAATGTGGTTTTAAGAATGATTGTAGGAAAGGGATGCAATTCATGGATAGTG  
 AAGAATGGAAAGAAGTATTAAGTATTTTTGAAATGAGTGGTAAGTTTGTGGTGTGAGATGCA  
 TTGCCGTTTTTGGAGATGGTTGGATATAGGGGGTGATGAGAGGTCAATGAAGAAGATTGCCAAAG  
 AATTAGACGTTGTTGTTCAAGGATGGTTAGAAGAGCACAAGATGAAGAGAGATTCTCAGGAAAT  
 GAATCAAGAAGAAGAAGATTTTATGTATGTGATGCTTTCGATTTTAGGAGATACAGAGCAATATT  
 ATGGTCGTGATGTTGATACAATCAATAAAGCTATTTGCCTGGGTCTCATCTTAGCAGCAACGGACA  
 CCACAGCTGTTACATTGACATGGATTATCTCCCTGCTTCTCAATCATCATGATATTCTAAACAAGGC  
 TCGAAATGAACTAGATATTCAGGTGGGCACAAAAGGCAAGTGAATGAATCAGATATAAAAAAATT  
 TAGTTTACTTACAAGCCATTCTTAAAGAAGCAATGCGTTTATATCCTGCTGCGCCACTCTTAATTCC  
 ACACGAGTCTATAGAAGAGTGACAGTAAGTGGTTACAATGTTCCCAGCGGCACACAACTTTTTAT  
 CAACGTTTGAAGCTTCAACGTGATCCACATGTCTGGGAAGAGTCTTGTAAAGTTTCAGCCAGAAA  
 GATTTTTGACAAGGCACAAGGATACTGATGTCAGGGGACAAAATTTGAATTGTTACTTTTAGTA  
 GTGGCAGAAGAATGTGTCCTGGAGTTTCATTGCCCCCAAGTTATGCAATTTACACTTGCTTCTTT  
 ACTTCATGGCTTTGATATTGCAACCCATCAAATGAACCATTGGACATGGGGGAGGGATTAGGGT  
 TGACCGTAGAGAAATCTACACCCTTGAAGTACTTGTGCTCCACGTCTTTCTGCTTCTTTGTACGG  
 C

#### **CYP82D92 (Cit5)**

ATGGACTTCCTTGTTTTAAACATCTCAACCAACTACTGCAGCTGCAATTTTAACTCTTTTA  
 ATCTTTTCATATATTTTGTGTCGGTTTCAAGAACTTGCTTACAAATTACACAAGCAAG  
 AAGAAGAGGAGAGCACCAGAAGCCGGAGGAGCATGGCCTGTGACTGGACATCTACACCTC  
 TTAGGAGGGCCAGAGCCTCCTCACAGGGTGTGGGCGCCATGGCTGACAAGTATGGACCA  
 ATCTTACAATCAAGATGGGCGTAAATCGAGCTTTAGTTGTGAGTAATTGGGAGATGGCT

AAAGAGTGTCTTACTACACACGACAAAGTCTTTGCCAGCCGTCCAAAACTCTAGCCATG  
GAGATTTTTGGCTACAATTTTTCCATGTTTGGCTTCAGCCCATACGGCTCCTACTGGCGT  
GAGATACGCAAGATAGCCACAGTTGAGCTCCTTTCAAACCATCGGCTTGAGAAGCTCAAG  
CATGTACGAGACTACGAAGTGAAGACATGTCTGAAGGAGTTATATGAGTTATGGGACAAG  
AACAAAAGCACTAATGAGATGTTGTTGGTAGAGCTGAAAAGATGGTTTGCAGACACCATC  
CGTAATGTGGTTTTAAGAATGATTGTAGGAAAGGGATGCAATTCAGTGGACGGTGAAGAA  
TGGATGGAECTACTAACGAGATCTTTTGGAGATGAGTGGTAAGTTTGTGGTGTGAGATGCA  
CTGCCGTTTTTAAGATGGTTGGATATAGGGGGTGGATGAGAGGTCAATGAAGAATATTGCC  
GAAGAATTAGACAATCTTCTTCAAGGATGGTTAGAAAAGCACAAAGAGGAAGAGAGATTCT  
CAGGAGATGAAAGAAGAAGAATTAGATTTTATGAGTGTGATGCTTTTGATTCTAGGAGAT  
AAAGAGCAATATTCTGGTCGTGATGTTGATACAGTCAACAAAGCTACTTGCCTGGGTCTT  
ATCTTAGCAGCAACAGACACCACAGCAGTAACATTGACATGGGTTATCTCTTTGCTTCTC  
AATCATCGTGACATTCTAAATAAGGCTCAAACGAGCTTGATATACAGGTGGGCACAAAA  
AGGCAAGTGAATGAATCAGATATAAAAAATTTAGTTTACTTGCAAGCCATTCTCAAAGAA  
ACAATGCGTTTTGTATCCTGCTGTGCCACTCTAGTTCCATGAGTCTATGGAAGAGTGC  
ATAGTTAATGGTTACCATGTACCAGCCGGCACACAAATTTTTATCAATGCTTGAAACTT  
CAACGTGATCCGCGTGTCTGGGAAGAGCCATGTAAGTTTCACCCAAAAACATTTTTGACA  
AGGCAGAAGGATATTGATGTTAAGGGACAAAATTTGAATTGTTACTTTTAGTAGCGGC  
AGAAGAATGTGTCCTGGAGTGTCAATTTGCCCTCCAAGTTATGCAATTTACACTTGCTTCT  
TACTTTCATGGCTTTGATTTTGAACCCCATCTAATGAACCGGTGGACATGGGTGAAGGA  
TTAGGGTTGACCATGGAGAAATCTACACCCTTGAAGTACTTGTGGCTCCGCGTCTCTCT  
GCTTCTCTGTATGGC

**CYP82D82 (Cit7)**

ATGGCCTTTTTTGCATCCCAAACAAGTGTGTAGCTGCGATTTTAAACCCTTATAATCTTTCTATACAC  
TTTTGTTGTTGTTTGTTCAGAAATTACGCAAGCAATAAGAAGAAGAGAGGACCTCCAGAAGCTG  
GTGGAGCATGGCCTGTGATTGGGCATCTACACCTTTGGGAAGGTTCCCCCTTACAGAGTGTG  
GGAGACATGGCTGACAAGTACGGACCAATCTTACAATCAGGATGGGCGTACATCGGGCTTTGGT  
GGTGAGCAATTGGGAGATGGCTAAAGAGTGTCTCACTACACATGACAGAGTCTTTGCCAGCCGTC  
CAAAGCTCTTGTGCGAGAGATATTAGGCTTCACTTTTCCATGTTTGGTTTTCAGCCCATATGGTCC  
CCATTGGCGCCAGATACGCAAGATAGCCACACTTGAGCTTCTCTCAAACCATCGGCTTGAGAAGCT  
CAAGCATGTTTCGAGAAGGCGAGGTGAAGACTTGTGTTGAAGGAGTTATATGACTTTTGGGAACGTA  
CGAACAATTACAAAAGTTCGGATCATAATAACAACAAGAAGGTATTGGTGGAGATGAACAAATG  
GTTTGAGGATGTAACCCTTAATGCGATCTTAAGGGTAACGGTTGGACAAAGATGCAATTCATCATC  
ATCACAAGAGGATACCGATCATGAAGGAGCATGGAAAGAGGAATTGACCAAATTTTTTGCATTTA  
GTGGTAAGTTCGTGGTGTGAGATTGCTGCGTTTTTGGAGATGGTTTATAGGGGGAGATGAG  
AGGGCAATGAAGAAGAACGCTAGGGAGTTAGATGTTTGTAGCTCAAGGGTGGTTGGATGAGCACA  
AGAGGAAAAGAGAATCTGGCCAGATGATAAACAAGAAGGTCATGAAGATTTTATGGATGTGAT  
GCTTCCATTTTGCGGGATGATGCCCAACAATTACCAGGTGATGATGCTGATACCATCAACAAAGC  
TACATGCCTGGCTCTCATATTAGCGGCATCAGACACCTCGAAAATAACATTAACATGGATTTTATCT  
TACTTCTCAACCACCGTGTGTTTTAAAGAAAGCTCAAATGAACTAGACGTTTATATTGGTAAA  
AGAAGACAAGTGAATGAATTAGACATAAAAAATTTGGTTTATCTCCAAGCAATTATCAAGGAGGC  
AATGCGTCTTTACCCTGCCGGACCACTGCAGCCCCGCATGCGTCTACGGAGGATTGCACTGTCAA

TGACTACTTTGTGCCAGCAGGCACTGTACTATATGTTAACGTTTGGGAAGATTCATCGCGATCCACG  
 AGTTTGGCCAGAACCTTATAAGTTTAAACCTGAGAGATTTCTTACCACCCACAAACATATTGATGTT  
 CGTGGCCAGAATTTCGAACTGTTACCGTTTAGTAGTGGCAGAAGAATGTGCCCTGGACCCTCATT  
 GCCATCCCAGTTACGCACCTTACACTTGCTACTTTGTTACATGGGTTTATTGTTGAAACCCCGTTGG  
 ATGAACCAGTTGATATGAGTGAGGGAATGAGCTTGACTCTGGTTAAACCACTCCCGTTAAAGTA  
 CTCATCACTCCACGTCTTTCCGCATCGCTATATGGC

**CYP82D84 (Cit9)**

ATGAATTTCTTCTCCCATATCTAGACACCAGCATAGTAGTGGTTGGTGCCTGTGCTACACTTGTGCG  
 TTTTCTATTATTTACAAAATGGTCCAACACCGGCAAAAACCACCGGAAGCTGCTGGAAAATGGC  
 CGATGATCGGACATCTCCACCTCTTAGCAGGACCCCAACTCCCTCACCTTGCCTTGGGCGCCTTAG  
 CCGACAAGTATGGACCATTATTCAGCATCCGAATTGGCGTGACCCAGCCCTGGTGGTCAGCAGC  
 TGGGAGATGGCTAAAGAATTGTTACCAAGCATGATGTTGACATATCCTCTCGCCCCAAGCTCACT  
 GTTGGCAAACCTCTTAGGCCACAACCTATGCCAATTTTGGGTTCTCTCCTTACAACGCATACTGGCGT  
 GAGATGCGCAAATAACAGCTTTGGAGCTTCTCTCAAACCGCAGACTTGAGTTACTCAAGCATATT  
 CGGGCTACTGAAGTGAAGGCCGAAATAAAAGAGTTATACAAGATTTGGACCAAGAAAAAGAACG  
 AGTCAGACCAAATTTTGGCTTGAGATGAAAAATGGTTTGGGGACTTGAATTTGAACGTGATTCTAA  
 TGATGATCGCTGGGAAAAGGTATTTTGGTGTAGAGCTGAGAATGATGAGACAGAAGTGAGGCG  
 CTACAGGGCCGCAATAAGGAATTTTTTTCGTTTGGGTGGGGTTTTTTTAGTAAGAGATGCTTTGCC  
 TTTTCTTGGATGGCTTGATATTGGTGGATATGAAAAGGCCATGAAGAAAACCTGCCAAAGAATTGG  
 ACAGCGTTATTGAGGAATGGATAGAGGAACATCGCCGAAAAAGAATCCGGTACCAATCTGGA  
 TCTGGACTTCATCGACGTGCTGCTATCCGTTCTTGAAGGTGAAGGTGTTGACCTTCTGATTTTGT  
 GTTGATACAGTCATCAAAGCCACTACCATGACTATAATTGTAGGGGCCACTGATACCACGACTGTT  
 AATCTAACATGGGCACTCTCATTACTGCTGAATAATGGCCGGAATAGGATAAAGTCAAGAAAGA  
 ATGGGAGTCTGTAGTTGGCAAGGAAAGAGTATTACGGGAATCAGATATTGAGAAGTTGGGGTAT  
 GTTCAAGCTGTAATAAAGGAGACGGTACGATTGTACCCTGCTGGACCACTTGACAGGCAAGACA  
 GTTCACTGAAGATTGCACAGTTGCTGAATACCAAGTCCCAAAGGAACCCGGCTCGTGCTTAACCT  
 TTGGAAGTTGCAGACAGACCAAGGGTGTGGTACGATCCATTGGAATTCAAGCCTGAAAGATTTT  
 TGACCACTCACAAGGATGTTGATGTCAAGTGTCAACATTTTGAACCTTCTCCATTTGGTGGTGGTA  
 GAAGAGCCTGCCCTGGAATATCATTGCTTTGCAAATGTCACATTTGGCTCTGGCCGCTTTCCTGCA  
 TGCATTGACATATCAACTCCGGGGGAGGCATGGGTTGATATGACTGGAACGGCGGGGTTGACC  
 AACATCAGGGCAACTCCACTTGAAATCTTTTGAACCCGCTTGCCTTCTAATCTCTATGAA

**CYP82D81 (Cit10, *C. paradisi*)**

ATGGGCATTCTTGTTCATCTCAAACAAGTGCTGTAGTTGCAATTTAATCACCCTTTTAATCATTCT  
 ATACACGTGTTTTCTATTTTCAAGAAATTTGCTTAGAAAATGCATAGGCAAGAAGAAAAGGGGAG  
 CACCAGAAGCAGGTGGAGCTTGGCCAGTGATTGGCCATCTACACCTTACGAGGGCCAAAACCT  
 CCTTACAGGGTGTTCGACAAAATGGCTGACAAGTATGGACCAATCTTATTATCAGGATGGGCAA  
 AAATCCAGCTTTAATCGTGAGTAATTGGGAGATTGCTAAAGAGTGTCTCACAACACATGACAAAG  
 TCTTTGCCAACCGTCCGAAAACCTAGCCATGGAGATTTTAGGCTACAATTTTTCCATGTTTGGCTT  
 CAGCCCATATGGCTCCTACTGGCGCGAGACACGCAAGATAGCCACACTTGGGCTTCTCTCAAACCA  
 TCGGCTTGAGAAGCTCAAGCACGTACGAGAATACGAGGTGAAGACATGTTTGAAGGAGTTATAT  
 GAGTTATGGCACAAGAACAAGCACTAATAAGATATTGCTAGTAGGGATGAAGAAATGGTTTG  
 GGGACACCTCCGTAATGTGGTTTTAAGAATGGTTGTTGGAAAGGGGTGCAATTCAGTGGATAGT

GAAGAATGGAAAGAACTACTGACGAGATTTTTGAAATGAGTGGTAAGTTCGTGGCGTCAGATGC  
TCTACCGTTTATGAGATGGTTGGATATAGGGGGTGTATGAGAGGTCAATGAAGAAGATTGCCAAA  
GAATTAGACGTTATTGCTCAAGGATGGTTAGAAGAGCACAAAGAGGAAGAGAGACTCTCAGGAGA  
TTAAAAAAGAAGAAGATTTTATGTATGTCATGCTTTCAATCCTAGGTGATACAGAGCAATATTTGG  
GTCGTGATGTTGATACAATCAATAAAGCTATTTGTCTGGCTTTATCTTGGGAGCAGCAGACACCA  
CAACAGTAACACTGACATTGGTTATGTCTTTGCTTCTCAATCATCGTGATATTCTAAACAAGGCTCA  
AAATGAACTAGATATCCAGGTGGGCGCAAAAAGACAAGTGAATGAATCAGATATAAAAAATTTA  
GTTTACTTGCAAGCCATTCTCAAAGAAGCAATGCGTTTGTATCCGGCTGGGCCACTTTTAGTTCTCT  
ATGAGTCTATAGAAGAATGCACAGTTAATGGTTACCATGTCCCTGCCGGCACACAACCTTTTTATCA  
ATGCTTGGAAAATTCACGTGATCCAAGTGTGGGAAGAGCCATCTAAGTTTCAGCCAGAAAGA  
TTTTTGACGAGGCATAAGGATATTGATGTTAAGGGACAAAATTTTGAATTGCTACCTTTTAGTAGT  
GGTAGAAGAATGTGTCCTGGAGTGTCAATTTGCCCTCCAAGTTATGCAATTTACACTTGCTTCTCTAC  
TTCAGGGATTTAATTTTGCAACCCCATCTAATGAACCAGTGGACATGGGTGAAGGATTAGGGTTG  
ACCATGGAGAAATCTCAACCATTTGAAGTACTTGTTACTCCACGTCTTTCTGCTGCCTTCTACAGC

**CYP82D81 (Cit10, *C. hystrix*)**

ATGGGCATTCTTGTTTCATCTCAAACAAGTGTGTAGCTGCAATTTTAATCACCTTTTAATCATTCT  
ATACACGTGGTTTCTAGTTTCAAGAAATTTGCTTAGAAAATGCATAGGCAAGAAGAAAAGGGGAG  
CACCAGAAGCAGGTGGAGCTTGGCCAGTGATTGGCCATCTACACCTTTACGAGGGCCAAAACCT  
CCTTACAGGGTGTTCGACAAAATGGCTGACAAGTTTGGACCAATCTTTATTATCAGGATGGGCAA  
AAATCCAGCTTTAATCGTGAGTAATTGGGAGATTGCTAAAGAGTGTCTCACAACACATGACAAAG  
TCTTTGCCAACCGTCCGAAAACCTAGCCATGGAGATTTTAGGCTACAATTTTTCCATGTTTGGCTT  
CAGCCCATATGGCTCCTACTGGCGCGAGACACGCAAGATAGCCACACTTGGGCTTCTCTCAAACCA  
TCGGCTTGAGAAGCTCAAGCACGTACGAGAATACGAGGTGAAGACATGTTTGAAGGAGTTATAT  
GAGTTATGGCACAAGAACAAGAACTAATAAGATATTGCTAGTAGAGATGAAGAAATGGTTTG  
GGGACACCTCCGTAATGTGGTTTTAAGAATGGTTGTTGGAAAGGGGTGCAATTCAGTGGATAGT  
GAAGAATGAAAGAAGAACTACTGACGAGATTTTTTGAATGAGTGGTAAGTTTGTGGTGTGATGC  
GCTACCGTTTATGAGATGGTTGGATATAGGGGGTGTATGAGAGGTCAATGAAGAAGATTGCCAAA  
GAATTAGACGTTGTTGCTCAAGGATGGTTAGAAGAGCACACGAGGAAGAGAGACTCTCAGGAGA  
TTAAAAAAGAAGAAGATTTTATGTATGTCATGCTTTCAATCCTAGGTGATACAGAGCAATATTTGG  
GTCGTGATGTTGATACAATCAATAAAGCTATTTGTCTGGCTTTATCTTGGGAGCAGCAGACACCA  
CAACAATAACACTGACATGGGTTATGTCTTTGCTTCTCAATCATCATGATATTCTAAACAAGGCTCA  
AAATGAACTAGATATTCAGGTGGGCACAAAAGACAAGTGAATGAATCAGATATAAAAAATTTA  
GTTTACTTGCGAGCCATTCTCAAAGAAGCAATGCGTTTGTATCCGGCTGGGCCACTTTAGTTCTCT  
ATGAGTCTATAGAAGAATGCACAGTTAATGGTTATCATGTCCCTGTCCGGCACACAACCTTTTTATCA  
ATGCTTGGAAAATTCACGTGATCCAAGTGTCTGGGAAGAGCCATCTAAGTTTCAGCCAGAAAGA  
TTTTTGACGAGGCATAAGGATATTGATGTTAAGGGACAAAATTTTGAATTGTTACCTTTTAGTAGT  
GGTAGAAGAATGTGTCCTGGAGTGTCAATTTGCCCTCCAAGTTATGCAATTTACACTTGCTTCTCTAC  
TTCAGGGATTTAATTTTGCAACCCCATCTAATGAACCAGTGGACATGGGTGAAGGATTAGGGTTG  
ATCATGGAGAAATCTCAACCATTTGAAGTACTTGTTACTCCACGTCTTTCTGCTGCCTTCTACAGC

**CYP82D27 (Cit11)**

ATGGCTGACAAATATGGACCAATATTTCACTATGAAATTGGGAGTGAAGCAAGCTTTAGTGGTGAG  
 CAACTGGGAAATTGCCAAGGAGTGTTCACCAAAACGACAAAGCTTTTGCAGGTCGCCCAAAA  
 CAATGGCCATGGAGCTTTGGGGTACAACCTTGGTTCATAGGCTTCGCACCATATGGCAACTACT  
 GGCGTCAGTCACGTAAGATAGCCACAATTGAGCTTCTGTCAAATCGTCGGCTTGAGATGCTCAA  
 CATGTACGTGAATCCGAAGTGAAGGCTTCAATCCAGAGGTTATACAAGAACTGCATAAGTGGCAG  
 CAGTTCACGTAAAGTAGTTTCGGTGGAGATGATCCATTGGCTCGAGGGCACAGCACTTGACATTA  
 TTTTGAGAATAATTGCCGAAAACGTCACACTTCACAATCAAAGAGGTTAACGATTGGCAACAG  
 CAAATAACAAAGTTCCTACTGCCTTGTCTGGTCAAGTTCGTGGTGTCCGATGCGTTGCCCTTTCTGAGA  
 TGGCTAGATATCGGCGGCTATGAGAGATTAATGAGCAAGACAGCCAAATATTTTGACATCATTTT  
 GCAAGAATGGTTGGATGAGCACAAGATGAAAAGAGATTCTGGTGATGTTAAGGGCGACGAGGAT  
 TTCATGTATGTGTTGTTGTCCTTGCTTGATGATAATGCAGAGCAGCTTCCTGATCGCGATGCTGAC  
 GCTGTCATTAAGCAATATGCGTGACTCTAATCGTAGCGGCTGCAGACACCTCAGTAGTTACGTTG  
 ACATGGGCTATTGCTTTACTTCTCAACAATCGCGATGTTCTGAAGAAGGCACAAGATGAATTAGAC  
 ATTCAGGTTGGTACTGAAAGGCCAGTGAATGAATCGGACACGAGAAATTTGGTTTACTTGACAGGC  
 CATTATCAAGGAAACGATGCGTTTATACCCTGCTGCACCACTTTTACTACCTCAGAGTCTATAGAA  
 GAATGCGTCGTCATGGTTACCATGTCCCCGACAGGCACCCAACCTGTTTGTTAACGCTTGGAAGATT  
 CAACGCGATCCATGTGTATGGGAGGAGCCATGTCAATTCAGCCAGAAAGATTTCTTACGAGGTA  
 TAAGGATATTGATGTTAGGGGACAAGATTTGAATTGATACCATTTGGGAGTGAAGAAGAATGT  
 GTCCTGCAGTGCCTAGGCCTTCAAGTTATGCAACTAACGCTTGCTTATTAGTGCATGGGTTTG  
 ATTTTACAACCCCATCGGATGAACCGGTTGACATGGGAGAGGCAATGGGCCTAACCATTGCAAAG  
 GCTACTCGGCTTGAAGTGTGTTAGTCCGCGCCTTTCTGCCTTTCATATGGT

#### **CYP82D179 (Cit12)**

ATGGACTTTCTTGTTTACGTCAAACTAGTGCCATAGCTGCAATTTAATCACTCTCTTAATCATTCT  
 ATACACGTCGTTGTTAGTTTCAAGAAATTTGCTTAGCAAATACACAAGCAAGAAGAAGAGGGAAG  
 CACCGGAGGCTAGGGGATCATGGCCTGTGATTGGCCATCTACACCTTTAGGAGGGCCAGAACCC  
 TCTCACTGGGTATTAGGCAAAATGGCTGACGAGTATGGACCAATCTTCAAATCAAGATGGGCAT  
 AAATCGAGCTTTGGTTGTGAGTAATTGGGAGATGGCTAAAGAGTGTCTTACTACACACGATAAAG  
 TCTTTGCTAGCCGTCCAAAACCTAGCCATGGAGATTTTAGGCTACAACCTTTCCATGTTTGGCTT  
 TAGCCCATACGGCTCCTACTGGCGTGAGATACGCAAGATAGCCACACTTGAGCTTCTCTCGAACCA  
 TCGTCTTGGGAAGCTCAGGCATGTACGAGAGTATGAGCTGAAGACATCTTTGAAGGACTTATACG  
 AGTTATGGGACAAGAACAAGCACTAATAAGATGTTGTTGGTAGAGATGAGGAGATGGTTGAC  
 TGACACAATCCGTAATGTCGTTTTAAGAATGATTGTCGGAAAGGGATGCGACTCAGTGGATGGTG  
 AAGAATGGGTAGGACTACTGACGAGATTTTCTGAAATGAGTGGTAAGTTTGTGGTGTGAGATGCT  
 CTGCCGTTTCTTAGATGGTTGGATATAGGGGGTATGAGAGGTCAATGAAGAAGATCGCCAAAG  
 AATTAGACATTGTTGTTCAAGGATGGTTAGAAGAGCACAAGAGGAAGAGAGATTCTCAGGAGAT  
 TAAAGAAGAAGAATTAGATTTTATGAGTGTGATGCTCTCGATCCTGGGTGATGCAAAGCAATATT  
 CGGGTCATGATGTTGATACAGTCAATAAAGCTACTTGCATGGGTCTCGTCTTAGCAGCAACAGAA  
 AACACAGCGATGACATTGACATGGGTTATCTCTTTGCTTCTCAACCACCGTGATATTTTAAATAAAG  
 CTCAAACGAACTAGATATTCTGGTGGGTACGAAAAGGCAAGTGAATGAGTCAGATATAAAGAAT  
 TTAGTTTACTTGCAAGCCATTCTCAAAGAAGCAATGCGTTTGTATCCTGCTTCGCCACTCTCAATTC  
 CACACAAGTCTATAGAAGAGTGCACGATTAGTGGTTATAATGTCCCTACCAGCACACAACCTTGTTA  
 TCAATGTTTGAAGCTTCAACGTGATCCACGTGTCTGGGAAGAGCCTTGTAAAGTTTCAGCCAGAA  
 AGATTTTGAAGGCACAAGGATATTGATGTCAGAGGACAAAATTTGAATTGTTACCTTTTGGT

AGTGGTAGAAGAGCTTGTCTGGAGTTTCATTTGCCCTCCAAGTTATGGAATTTACACTTGCTGCTT  
TACTTCATGGCTTTGATTTTGCAACCCCATCAAATGAACCGGTGGACATGGGAGAGGCACTAGGG  
TTGAGTATCCAGAAAGCTAGACCACTTGAAGTACTCATTGCTCCACGTCTTTCTGCTTCTTTGTACG  
GC

**CYP71AN (Cit13)**

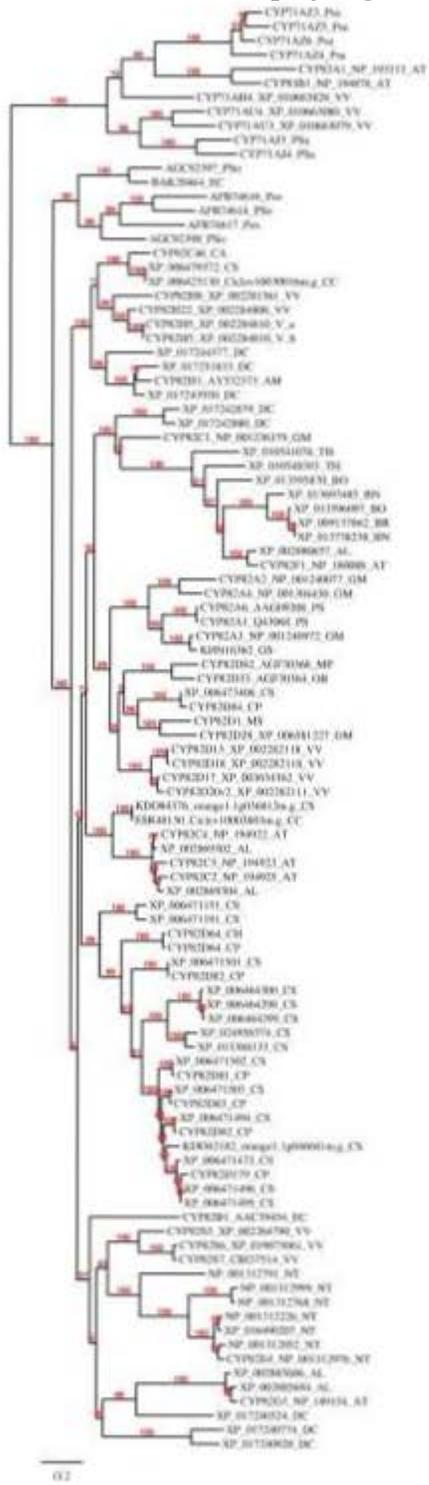
TCAACGTGCAAACCCCAATTGAAGCTTAAGTTGGGAATCCCAACCTGAAATGGCTCTGGTATCA  
GTCCTGATGAAGCAACTGCTGCAGCCTTTAATGGGCATATCAGAAATTTACAACCTCCTCTGTCC  
ATCTTTCTTCTTCTTATCCTCTTGCTCACACTTGTGCAGTTGCTGAAAATCACCAGACGTAGTAG  
TAACCATCTCAACTTACCTCCATCCCCACCAAAGCTCCCCATTCTCGGCAACCTCACCAGCTTCTG  
GAACTCTCCCTCATCGCTCTCTCAAAGCTCTTTCGGAGAGGTACGGCCTTTTGTATGTTGTTTACT  
TTGGCAATTCTCCAACCTTGTGGTTTCATCGGCTGAGTTGGCTGGTGGAGATGTTTAAACTCATG  
ACATTGTGATCTCGAACCGGCCAAAACACACCTGCTAACATCCTCGTATATGAATGCCAAGATA  
TCACGTTCTCTAATTACGGCGAGTACTGGAGACAAGCTCGGAAGATTTGTATTCTTCAACTCTTGA  
GTGTGAGAAGAGTGCAATCATTTAGTATGTTAGAGATGATGAAGTTTCAAGTTTGGTAACTAAA  
ATTGCGCTCTCGTGTCTTAATAAAGGAGGTCCTCTTAATTTAACAGAGATGCTACTGACTGCTTCCA  
GCAATATAGTTTCCCTCTGCGTTCTTGGGAAGAAAGCTGATGAAGAAGAAGAAAATATTGGAGAC  
AGCAATAAGCTGGGAGAGTTGTCAAGAAGGCTGGAAGAGCAGCTTCTGCCTTTTGTATGGGAG  
ATATGTTTCCATCTTTGGCATGGTTAGATGTTCTCTCGGGATTATTGGTCTCTCAACGCAACTGC  
TAGAGCATTTGACGCTTTGCTTGATCAGGTGATTGAAGAGCACACGAACAAGGTATCAAAAAGGAA  
GTGGGCATGATGATGACCAATCTGATAAAAAGACTTTGTGGATATACTCCTCCAACCTTCGAAAG  
GATGGCATGCTTGGGGCAGAGCTCTCTCAGGACAATCTTAAAGCAATTATCCTTGTCTGTCTTCC  
TCTCAACCAGCTAGTCTTAATTCTTTAATTATTAGCTCTCTCCTTTTCAAAAAAAGAAAAAATAT  
TAGCTCTCTATATTTTTACATCTTTACATACATCATGCACGCAAAACCGCGCTCTTGCATATACA  
TAAACATACATCAATACTAAAGGCTTTTTCATGTTTTCACATTCTCAGGACATGTTTGTAGCAGGAACT  
GAGACTACTGCAACAACACTAGAGTGGGCAATGGCAGAGCTAGTGAAAAATCCAACCTAGTATGA  
ACAGAGTTTCGAGAAGAGGTTAGAAGTGTGGCAAAAGGGAAATTAATATAGACATGAAGGAAAT  
TGAGAAGATGGACTATTTGAAATGTGTTGTCAAAGAACTCTGAGGTTACATCCACCAGTTCCTCT  
CTTGGTCCGCGAGAAATGGCAGAGAGTATCAAATGGAGAGGTTATGATATTCCTGCAAAAACCTA  
GAGTGATTGTAAATGCATGGGCAATCAAACAGATCCCCAAGTTTGGGACAGGCCAGAAGATTTCT  
TTGCCAGACAGGTTTTTCGCTAACCCGGTGGATTGTAAAGGCCGAGACTTCCAATTTATCCCCTTT  
GGTGCTGGAAGAAGAGGATGCCAGGGATATCATTTGCGTTAGCTGCAGTTGAGTATGTGATGG  
CCAACCTTTTGTACTGGTTGATTGGAATTTGCCTCTTGGTGAAGTTGAGGAGAATTTGGACATGT  
CTGAAGTTAATGGGCTAGTGGTTCATAAGAAATTACCTCTTCATCTTGTGCCAACGCTCTACTCCCC  
TTGCTCTTAATCTTGATATGTCTAGAAAAATATCCATTGTAATTATTTCTAATCATGATTATCCTCT  
TTCAATCCCTCTTGTGAAAAATTGTACCAGTGTGCTATTTTCTTCTATGTTTCATGGACACCTTGA  
GGAGCAAGTTATTACCAATAAAATTTTATC

**CYP706J12 (Cit18)**

ATGTTTTCGGTTATCAACATGTTTCCGAAGTTTCTCTCCGGGTTATTTGGGTTAGTCTTAGAAATCT  
GGTCACGGTGGTGGGATTTACTCAATAAGCACACTACCGTTTTGGCAGCTGCAATATTTGCTGTTT  
CTTGGTACGCATGGTGGATTAAGAAATCACTAGAAAGATTCAGCCACTGCCACCAGGACCTCGA  
GGCTTGCCCTTTGTAGGAAATCTCCATTTATTGAACCTGATTTGCATAGTTACTTCGCAAAAACCTGT

CTCAAATTTACGGTCCAATCTTCAAACCTCAACTGGGGAGAAAAGTTTGCATTGTGATAAGCTCAG  
CTCCATTGGCAAACAGGTCTTGAAAGGACACGATGCGATATTTTCCAACCGCGGTGACCCACCT  
GCCGCAGCATTTCAAGCCACGTACGGCGCAATAGACATAGCATTTAGCCCTAACTGCCCTGAATG  
GCGTACGTTGCGCAAAGTTTTTCGTTAGAGAAATGATGAGTAACTCAGGCCTGGATGCTTGTTATG  
CAATTCGTCAGGAAGAAGTGAAAGAAATGTTAAAGGAAGTGTACGGGAAAATCGGTTACCCCGT  
TAATATAGGTGAGCTAATGTTCCCTAACTACACTAAATGCGACCACAAGAATGTTATGGGGGACTTC  
GCTTCGTGGAAAGGATAGGGACATCGGTGATGTTCAAATCAGGCATGTAGTGAGGGAAATTATC  
GACTTGATAGGAGCACCAAACATTTCTGATTTTTTTCCCGTACTTGCTCGATTTGATGTACAAGGG  
GTTGAATCAAAAGCAAAGAAGCATATGCTGCTGTTTCGATAAGCTTTTTCGAGTCCTCAATAGGCAGT  
CGGATGAAAGATGAATTAGCCTCTGGAGAGGAAAAGAAAGATGGGAAAGTCAGCAAGAACTTTC  
TTCAGTTTCTGTTGAAGCAATCTTCCTTATCCATAAACCAAATTAAGGCTTTGTTTGTGGATGTCATT  
TCCGGAAGTACGGATACATCATCAACCACAGTAGAGTGGGCAATGGCAGAAGTCTACAGCATCC  
GGAGATAATGAGAAAAGCATGCAAAGAGTTGGAGCAAGTGGTAGGCAACGACAACATTGTAGA  
AGAAGTTCATACTGCTAAGCTGCATTATTTAAATGCAATACTTAAAGAAACATTGCGGTTGCATCC  
GCCATTGCCACTCCTATTACAGCACAGCCCAAGTACAACCTTGCAACTTGTCTGGGTATTCCATTCCC  
AAGGGGTCAATAGTTTATGTTAATGTGTGGGCTATACATAGGAATCCTGAGGCTTGGAAAAACCC  
CCTGGAGTTTCAACCGGACAGGTTCTAAAAGATGGTGAATTAGGTGATTTTCGAGGAAACAATT  
TCAATTATCTTCCATTTGGTTCGGGAAGGAGGGTCTGCGTTGGAATTCCTCTAGCAGAAAAAATGG  
TACTTCATGTGTTAGCTAACCTATTGCATCATTTTAAAGTGAATCTGCCAGAGGGAATGAAGCTTG  
ATTTATCCGAGAAGTTTGAATTGTGTTGAAAAAATCAGAACCCTCATGGCCATTCCAACCTGCAA  
GATTATCCATTTACATCATCATCATCATTGA

### Annexe 7. Arbre phylogenetique original avec valeurs bootstraps



## Annexe 8. Protocole de préparation des bactéries électrocompétentes

### 1- Préparation de la pré-culture

- La veille au soir, à l'aide de l'oese, prélever stérilement une goutte de stock glycérol et réaliser un isolement sous hotte à flux vertical stérile sur LB solide de la souche *E. coli* Gene Hogs WT.
- Incuber à 37°C jusqu'au lendemain après-midi (vers 14h)
- Le lendemain en début d'après-midi (vers 14h), ensemencer, **à partir d'une seule colonie isolée**, 2 tubes Falcon annotés « A » et « B » avec 30 mL de LB liquide (une colonie par tube).
- Incuber sous agitation forte à 200 rpm à 37°C jusqu'au lendemain matin 9h.
- En fin d'après-midi (vers 17h), ensemencer à partir de ces précultures : 1 LB solide ; 1 LB solide + Ampicilline (100 mg/L) ; 1 LB solide + Spectinomycine (100 mg/L) et 1 LB solide + Kanamycine (50 mg/L).
- Incuber à 37°C.

Ceci dans le but de vérifier le lendemain avant le démarrage de la manipulation que la souche Gene Hogs WT est bien pure et non résistante aux antibiotiques testés.

### Lancement de la culture

- Vérifier que les 2 précultures liquides A et B de la nuit ont bien poussé (trouble visible)
- Vérifier la présence d'un seul type de colonie sur LB solide et l'absence de colonies sur les autres milieux LB + antibiotiques.
- Ensemencer ensuite 2 Erlen « A » et « B » contenant 200 mL de LB liquide avec 10 mL des précultures liquides « A » et « B » correspondantes réalisées sans antibiotiques.
- Incuber sous agitation à 37°C 2h à 2h30.  
NB : pour limiter la phase de latence, il est conseillé de laisser les Erlen contenant 200 mL de LB liquide à température ambiante sous la hotte avant l'ensemencement avec la préculture.
- Après 2h00 à 2h30 de culture, vérifier que la  $DO_{600\text{ nm}}$  soit comprise entre 0,6 et 0,8 (optimum  $DO_{600\text{ nm}}$  : 0,6 - 0,7, soit le début de la phase exponentielle de croissance, là où les bactéries sont en conditions physiologiques optimales).

### Traitement des cultures

- Si la mesure de DO<sub>600 nm</sub> est bonne, arrêter la culture et placer les erlens immédiatement dans un bac de glace environ 30 minutes.  
NB : à partir de cette étape, tout doit se faire impérativement à froid. Eviter également le moindre choc physico-chimique pour ne pas altérer l'efficacité des cellules traitées.
- Répartir stérilement 40 mL de ces 2 cultures « A » et « B » dans 2 séries correspondantes de 3 tubes Falcon 50 mL notée « A » et « B ».
- Centrifuger 15 min à 4 000 rpm et à 4°C dans la centrifugeuse Jouan Br4i. Le frein et l'accélération doivent être mis à 2.  
NB : Pour que cette première centrifugation soit réellement à froid, la faire tourner quelques minutes avant pour qu'elle soit redescendue en température.
- Jeter le surnageant dans le flacon en verre « déchet » et resuspendre stérilement et délicatement sur la glace le culot dans 20 mL d'eau ultra pure stérile froide sous hotte à flux vertical.  
NB : Agiter manuellement et doucement par rotation les tubes Falcon en maintenant au niveau du bouchon et les redéposer régulièrement dans la glace afin de les maintenir à froid.
- Centrifuger de nouveau la suspension cellulaire 15 min à 4 000 rpm et à 4°C puis éliminer le surnageant.
- Répéter les 3 points précédents.
- Resuspendre délicatement et stérilement comme précédemment **le culot d'un seul tube Falcon** dans 20 mL de glycérol 10 % stérile et froid sous hotte à flux vertical puis reprendre avec cette solution bactérienne de 20 ml 1 à 1 les autres culots correspondant afin d'obtenir une concentration cellulaire finale élevée.
- Centrifuger de nouveau 15 min à 4 000 rpm et à 4°C puis éliminer le surnageant.

#### Aliquotage et stockage à -80°C

- Resuspendre stérilement le culot dans 1 mL de glycérol 10 % froid stérile sous hotte à flux vertical sur la glace
- Laisser reposer les cellules dans la glace au minimum 1h pour améliorer la compétence.
- Aliquoter par volume de 45 µL des tubes PCR stériles de 0,2 mL sur glace et congeler dans l'azote liquide puis stocker les aliquots à -80°C.
- Avec le fond restant des suspensions, ensemercer sur 1 LB solide ; 1 LB solide + Ampicilline (100 mg/L) ; 1 LB solide + Spectinomycine (100 mg/L) et 1 LB solide + Kanamycine (50 mg/L).

Ceci afin de vérifier qu'aucune contamination n'a été apportée durant les différentes phases de manipulation et que l'on possède donc la souche toujours pure.

- Incuber à 37°C et vérifier le lendemain la présence d'un seul type de colonie sur le LB solide et l'absence sur les autres milieux de culture.

NB : Les bactéries peuvent être utilisées immédiatement mais leur compétence est supérieure si on les utilise le lendemain après congélation.

- Le lendemain de la congélation, décongeler plusieurs aliquots de 45µl de cellules et réaliser le protocole d'électroporation avec 0,1 ; 1 ; 10 ng de plasmide afin de vérifier que la souche est bien électrocompétente. Il doit y avoir plusieurs dizaines de colonies à 0,1 ng.

## Annexe 9. Solutions stocks pour la culture in vitro d'agrumes

| Macroéléments BH3 100X               |        |
|--------------------------------------|--------|
| MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O | 37 g/L |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 17 g/L |

| Microéléments MT 100X |        |
|-----------------------|--------|
| Duchefa M0301         | 100g/L |

| Vitamines de Tucker (MT) 100X |         |
|-------------------------------|---------|
| Myo-inositol                  | 10 g/L  |
| Thiamine-HCl                  | 1 g/L   |
| Pyridoxine-HCl                | 1 g/L   |
| Acide Nicotinique             | 0.5 g/L |
| Glycine                       | 0.2 g/L |

| Fer MT 200X *à autoclaver            |          |
|--------------------------------------|----------|
| Na <sub>2</sub> EDTA                 | 7.45 g/L |
| FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O | 5.57g/L  |

| Sucres alcool 100X *à autoclaver |        |
|----------------------------------|--------|
| Fructose                         | 25 g/L |
| Ribose                           | 25 g/L |
| Xylose                           | 25 g/L |
| Mannose                          | 25 g/L |
| Rhamnose                         | 25 g/L |
| Cellobiose                       | 25 g/L |
| Galactose                        | 25 g/L |
| Glucose                          | 25 g/L |

| Acides Organiques 100X |       |
|------------------------|-------|
| Pyruvate de sodium     | 2 g/L |
| Acide citrique         | 4 g/L |
| Acide malique          | 4 g/L |
| Acide fumarique        | 4 g/L |

| Macroéléments MT 100X                |          |
|--------------------------------------|----------|
| KH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>      | 82.5 g/L |
| KNO <sub>3</sub>                     | 95 g/L   |
| MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O | 18.5 g/L |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 7.5 g/L  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 1 g/L    |

Annexe 10. Article en co-premier auteur (soumis et accepté).

## **Comparative study of the production of coumarins and furanocoumarins in three *ruteae* species.**

**Short running Title:** COUMARINS AND FURANOCOUMARINS IN *RUTEAE*

**Keywords:** *Ruta angustifolia Pers.*, *Ruta chalepensis L.*, *Haplophyllum tuberculatum (Forsk.) Juss.*, coumarins, furanocoumarins, UHPLC-MS.

Saida Bergheul<sup>a,#</sup>, Mariana Limones-Méndez<sup>b,#</sup>, Jérémy Grosjean<sup>b</sup>, Alain Hehn<sup>b</sup>, Alexandre Olry<sup>b,\*</sup>, Abdellah Berkani<sup>a</sup>

<sup>a</sup>University of Mostaganem, Faculty of Sciences and the Natural Sciences and Life, Plant Protection Laboratory, BP300, 27000 Mostaganem, Algeria, <sup>b</sup>Université de Lorraine INRA – LAE - F54000 Nancy - France.

<sup>#</sup> contributed equally to the work

Saida Bergheul : [saidabergheul@yahoo.fr](mailto:saidabergheul@yahoo.fr), phone :

Mariana Limones-Méndez : [mariana.limonesm@univ-lorraine.fr](mailto:mariana.limonesm@univ-lorraine.fr), phone : 03 72 74 40 62

Jérémy Grosjean : [jeremy.grosjean@univ-lorraine.fr](mailto:jeremy.grosjean@univ-lorraine.fr), phone : 03 72 74 40 62

Alain Hehn : [alain.hehn@univ-lorraine.fr](mailto:alain.hehn@univ-lorraine.fr), phone 03 72 74 40 62

Alexandre Olry\* : [alexandre.olry@univ-lorraine.fr](mailto:alexandre.olry@univ-lorraine.fr), phone 03 72 74 40 62

Abdellah Berkani :

Within specialized metabolites, coumarins and furanocoumarins represent a wide group of structurally diverse compounds and are especially produced in plants belonging to the Rutaceae family. Here we performed the furanocoumarin and coumarin-targeted chemical characterization of three *Ruteae* species collected in Algeria. Detection and quantification of 27 coumarins and furanocoumarins extracted from stems and leaves was achieved by UHPLC-MS. We highlighted

significant chemical differences between these plants. *R. chalepensis* L. is the highest producer with  $24.83 \pm 1.25$  mmol/g dry material in stems and  $15.70 \pm 0.19$  mmol/g dry material in leaves while *Haplophyllum tuberculatum* (Forsk.) is the lowest producer. We also showed a surprising chemical diversity between *Ruta chalepensis* L and *Ruta angustifolia* Pers. This chemical diversity might therefore be a helpful tool for phylogenetic identification of plants.

## **Introduction**

*Rutaceae* is a diverse and widely spread family of mainly tropical trees and shrubs (1). These plants gather almost 161 genera and 1815 species distributed throughout the temperate regions of the world (2). The most represented genera of the rutaceae family are *Citrus*, *Zanthoxylum*, *Ruta*, *Ptelea*, *Murraya* and *Fortunella* (3). Both *Ruta* and *Haplophyllum* genera belong to the *Ruteae* tribe which gathered plants that share morphological traits such as the presence of actinomorphic, creamy-white to bright yellow flowers and specific classes of coumarins (4). Nevertheless, *Ruta* and *Haplophyllum* show also morphological and phytochemical differences which have been described previously in literature (5, 6). In Algeria, the aerial parts of these species are often used in traditional medicine as an herbal decoction to treat various pathologies: tumors, vomiting, digestive problems and carminative, against the bites of scorpions, diabetes and infertility (7). In other countries these plants are also used for their laxative, anti-inflammatory, anti-seizure analgesic, antispasmodic, abortifacient, antiepileptic, emmenagogue properties and for the treatment of skin diseases (8, 9). Among all the secondary metabolites produced by these plants many reports were dedicated to coumarins and furanocoumarins (10, 11). These molecules are of greatest interest since they have a broad range of biological activities. In plants, coumarins display important allelochemical functions and play a major role as phytoalexins in response to biotic stresses (12–15). A recent report highlights also the involvement of coumarins in root iron homeostasis (16, 17).

Many studies have focused on the beneficial effect on human health of furanocoumarins such as isoimperatorin, notopterin and bergapten. These molecules possess anti-inflammatory, analgesic,

anti-cancer and anti-coagulant activities (18). Furanocoumarins constitute a subclass of coumarins that are characterized by the presence of an additional furan ring branched at the C6/C7 or C7/C8 position of the coumarin core molecule (19).

They have pharmacological activities as, anti-coagulant (20), anti-inflammatory (21), antioxidant (22), antimicrobial (23). Xanthotoxin and bergapten possess photo-sensitising properties and are important drugs in the therapy of leucodermy (24). Psoralen derivatives can inhibit DNA synthesis and may be valuable in promoting skin pigmentation and treat psoriasis (25, 26). These molecules are also involved in the Grapefruit effect by inhibiting intestinal CYP3A4 enzymes (27–29). The production of these molecules is highly variable from one plant to another. In this report, we compare the production of coumarins and furocoumarins in the leaves and stems of *Ruta angustifolia Pers.*, *Ruta chalepensis L* and *Haplophyllum tuberculatum (Forsk.)* which are three species of the *Rutaceae*. We describe the extraction, identification and quantification of 27 coumarins and furocoumarins achieved by high pressure liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UHPLC/MS) (Figure 1). Furanocoumarins and coumarins are secondary metabolites produced in various concentration in rutaceae plants (10). In this report we assessed their production in 3 rutaceae collected in Algeria.

## Materials and methods

### *Plant Materials*

The aerial parts of plants were collected at flowering stage, in March 2013, from three different regions of Algeria: *R. chalepensis L.* was collected from Mostaganem (West region, 35°55'52" North, 0°05'21" East) at an altitude of 102m; *R. angustifolia Pers.* from Bordj Bou Arreridj (East region, 36°4' 0" North, 4°46'0" East) at an altitude of 906m and *H. tuberculatum* from Adrar (South region, 27°52'27" North, 0°17'37" West) at an altitude of 257m. The plants were identified by Dr. Sekkal, from the department of Biology, University of Mostaganem (Algeria). Specimens of the 3 species were deposited in the herbarium of the laboratory of plant ecology of university Ahmed Ben Bella 1

Oran (Algeria). The sample drying was carried out in the absence of light, at room temperature. They were weighed and then grounded in liquid nitrogen using a pestle and a mortar for subsequent phytochemical investigations.

*Extraction of Coumarins and Furanocoumarins*

The extraction was performed according to the protocol described by Dugrand and collaborators with some minor modifications (36). Briefly, 20 mg of dried leaves or stems were crushed into powder in liquid nitrogen, and then 800  $\mu$ L of 80:20 methanol:water solvent was added in order to solubilize the polyphenolic derivatives. Grounded material was homogenized by vortexing vigorously for 30 sec. The samples were subsequently incubated in an ultrasonic bath (Elma, Elmasonic S70) for 15 min in order to increase the extraction of polyphenolics. This methanolic solution was then centrifuged at 13200 g for 30 min. The supernatant was recovered and a second extraction was performed on the pellet in order to complete the extraction. The final solution was dried (Concentrator Plus, Eppendorf) overnight at room temperature. The pellet was resuspended in 100  $\mu$ l of 80:20 methanol:water solvent. Each extract was diluted 10 times in order to quantify molecules that were too concentrated in the stock solution (37).

*Identification of Furanocoumarins*

The chromatographic analysis was carried out using a NEXERA HPLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a photodiode array (PDA), a detector (SPDM20A, Shimadzu) combined with a mass spectrometer (single quadrupole, LCMS2020, Shimadzu) according to Dugrand *et al* (36).

*Quantification of Coumarins and Furanocoumarins*

Quantification was performed using angelicin as an analytical internal standard. This molecule is an angular furanocoumarin which is not present in the Rutaceae family. Angelicin was added at the

concentration of 5  $\mu\text{M}$  in the samples and in the calibration solutions. The calibration solutions contain all the molecules at the same concentrations ranging from 1 to 30  $\mu\text{mol. l}^{-1}$  (1, 3, 6, 12, 18, 24 and 30). The calibration curves were generated for each compound by connecting the peak intensity to the theoretical concentration of the standard in the solution. A linear regression was then performed as described elsewhere (38).

#### *Statistical Analysis*

All experimental measurements were performed in triplicate and were expressed as mean  $\pm$  SD of three analyzes (means  $\pm$  SD).

## **Results and discussion**

#### *Distribution of coumarins and furocoumarins in stems and leaves*

The analysis of the total amount of these molecules made evidence that *H. tuberculatum* is a poor producer of such molecules and produced them mainly in leaves (Table 1). These results are consistent with those of Arif and collaborators who reported the presence of low amounts of psoralen in *H. tuberculatum* (30). With 15 to 20  $\mu\text{mole/g}$  dry material, *R. chalepensis* accumulates the highest concentration of these molecules whereas *R. angustifolia* has an intermediate phenotype and produces 3-4  $\text{mmole/g}$  dry material. Interestingly, the distribution of these molecules is different between the 3 *Rutaeae* species. For *R. chalepensis* and *R. angustifolia*, equal amounts could be detected in stems and leaves. This distribution is unequal for *H. tuberculatum*: higher in stems in leaves for *H. tuberculatum* (5.7 time more) (Table 1).

To have a better overview of the production of these molecules in the plants we realized a detailed analysis of stems and leaves of the 3 plants. In the light of the overall analysis done on *H. tuberculatum*,

it was not surprising to highlight a very poor diversity of these molecules in the extracts. Only 6 different molecules (ie psoralen, osthol, heraclenin, aurapten and cnidicin) could be detected although at very low concentration (Table 2). This might be explained by the absence of umbelliferon which has been described to be the precursor molecule of the furanocoumarin biosynthetic pathway (31). Consistently, umbelliferon was highlighted in *R. angustifolia* and *R. chalepensis* and both of them are producing a large diversity of downstream furanocoumarins (10 for *R. angustifolia* and 18 for *R. chalepensis*).

#### *Phytochemical analysis*

Bergaptol, xanthotoxol, byakangelicin, byakangelicol, imperatorin, phellopterin, cnidicin and 6,7 dihydroxybergamottin are present in *R. chalepensis* and not in *R. angustifolia*. The absence of umbelliferon in *H. tuberculum* is however intriguing since its deriving prenylated derivatives, aurapten and osthol, could be detected in this plant. The major phototoxic furanocoumarins i.e bergapten, xanthotoxin and psoralen are present in high quantities. The organ distribution of the molecules is different between *R. chalepensis* and *R. angustifolia*. Regarding *R. chalepensis* only two different group of molecules can be observed: i) molecules which are detected nearly equal concentration in stems and leaves and ii) molecules which are present in higher amount in stems. None of them could be detected in significant higher concentration in leaves. All the molecules produced in higher concentration in stems (ie isopimpinellin, imperatorin, heraclenin, phellopterin, heraclenol and byakangelicol) are belonging to the xanthotoxin and the isopimpinellin clusters (32). Concerning *R. angustifolia*, this distribution is different. A first small group of molecules including the precursor (psoralen), xanthotoxin, and aurapten are detected in higher concentration in stem. Both latest molecules also belong to the xanthotoxin cluster. The second group is composed by two coumarins (limettin and osthol) and six furanocoumarins (bergapten, isoimperatorin, oxypeucedanin, heraclenol, oxypeucedanin hydrate, epoxybergamottin). Regarding the furanocoumarins they all belong to the bergapten and the isopimpinellin cluster (32).

### *Phylogenetical Analysis*

In previous studies, classification of *Ruta* and *Haplophyllum* genera based on morphological and phytochemical traits has been contradictory. Salvo *et al* made additional molecular analysis based on three different cpDNA sequences to establish the phylogenetic relationships (4). Whereas morphological and phytochemical trees relate *Haplophyllum* and *Ruta* closely, molecular analyses confirm their distant relationship within the *Ruteae* tribe. This result is consistent with our results, since *Ruta* species are able to produce high levels of furanocoumarins while *Haplophyllum* did not. Since recent years, new precise, fast and reliable analytical methods helped scientist to realize the chemotyping of plants and these methods became tools of choice to assess phylogenetic evolution of several plant genera. A report dedicated to the analysis of 23 eucalyptus and 64 Citrus species highlighted a distribution of total polyphenolics matching with their phylogenetic relationship (32, 33). Such a genus specific distribution of phenolics for licorice for whom the synthesis of different kind of phenolics (for example: saponins such as glycyrrhizin and glabridin; chalcones such as lichoalcone and kanzonol C; flavonoids such as liquiritigenin and kanzonol D) has been reported to be species specific (34). For *Astragalus* the distribution of 131 flavones, flavonols, flavanones, flavan-4-ols, isoflavones, isoflavans, petrocarpans and miscellaneous over 60 species (35) helps to identify genus with higher or lower commercial value of the roots. This report dedicated to 3 different Rutacea collected in Algeria allowed us to highlight 3 different chemotype in the same plant species. Whereas one species produces only low concentration of furanocoumarins other plants are able to synthesize significant amounts of those defense related molecules. The detailed analysis of the phytochemical profile highlighted a difference of type of molecules which are synthesized in the 3 plants. These differences might reflect 3 different branches of evolution of this genus and confirms that these molecules could be used as biochemical markers for phylogenetic studies.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the French Ministry of Sciences

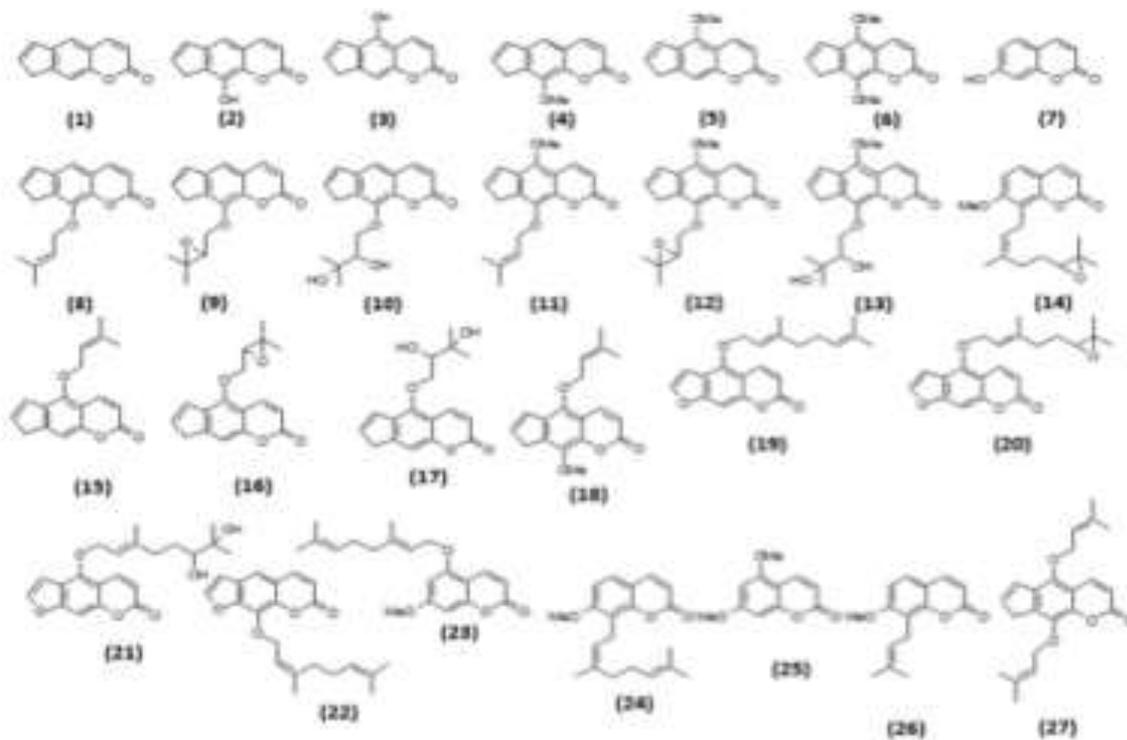
## References

- 1 Scott K D, McIntyre, C L, Playford J, Molecular analyses suggest a need for a significant rearrangement of Rutaceae subfamilies and a minor reassessment of species relationships within *Flindersia*, *Plant Syst. Evol*, 2000, **223**, 15–27.
- 2 Stevens P, Angiosperm Phylogeny Website, 2001, <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb>.
- 3 Siddique S, Nawaz S, Parveen Z, Khan R A, Khanum et al., Volatile components and antimicrobial activity of *Citrus sinensis* var. mosammi leaves oil, *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem*, 2012, **11**, 172–179.
- 4 Salvo G, Bacchetta, G, Ghahremaninejad, F, Conti, E, Phylogenetic relationships of Ruteae (Rutaceae): new evidence from the chloroplast genome and comparisons with non-molecular data, 2008, *Mol. Phylogenet. Evol*, **49**, 736–748.
- 5 Townsend C, Taxonomic Revision of the Genus *Haplophyllum* (Rutaceae) (Hookers Icones Plantarum), 2018, <https://www.abebooks.com/9780950487656/Taxonomic-Revision-Genus-Haplophyllum-Rutaceae-0950487651/plp>.
- 6 Silva M F, Das G F, Gottlieb O R, Ehrendorfer F, Chemosystematics of the *Rutaceae*: Suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family. *Plant Syst. Evol*, 1988, **161**, 97–134.
- 7 Haddouchi F, Chaouche T M, Zaouali Y, Ksouri R, Attou A, Benmansour A, Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria, *Food Che*, 2013, **141**, 253–258.
- 8 La grande flore en couleurs de Gaston Bonnier : France, Suisse, Belgique et pays voisins Bonnier, Gaston *Bibl. Spéc. Ville Paris*, <https://bibliotheques-specialisees.paris.fr/ark:/73873/pf0001707294>, 2018.
- 9 Raghav S K, Gupta B, Agrawal C, Goswami K, Das H R, Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells, *J. Ethnopharmacol*, 2006, **104**, 234–239.
- 10 Milesi S, Massot B, Gontier E, Bourgaud F, Guckert A, *Ruta graveolens* L.: a promising species for the production of furanocoumarins, *Plant Sci*, 2001, **161**, 189–199.
- 11 Ivanova A, Mikhova B, Stambolijska T, Kostova I, Lignan and coumarin glycosides from *Haplophyllum suaveolens*. *Z. Naturforschung C J. Biosci*, 2001, **56**, 329–333.
- 12 Beier R C, Natural pesticides and bioactive components in foods, *Rev. Environ. Contam. Toxicol*, 1990, **113**, 47–137.
- 13 Beier R C, Oertli E H, Psoralen and other linear furocoumarins as phytoalexins in celery, *Phytochemistry*, 1983, **22**, 2595–2597.
- 14 Niro E, Marzaioli R, De Crescenzo S, D’Abrosca B, Castaldi S et al., Effects of the allelochemical coumarin on plants and soil microbial community, *Soil Biol. Biochem*, 2016, **95**, 30–39.
- 15 Yan Z, Wang D, Cui H, Zhang D, Sun Y, Jin H et al., Phytotoxicity mechanisms of two coumarin allelochemicals from *Stellera chamaejasme* in lettuce seedlings, *Acta Physiol. Plant*, 2016, **38**, 248.

- 16 Schmid N B, Giehl R F H, Doll S, Mock, H P, Strehmel et *al.*, Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-Dependent Coumarins Mediate Iron Acquisition from Alkaline Substrates in Arabidopsis, *Plant Physiol*, 2014, **164**, 160–172.
- 17 Siwinska J, Siatkowska K, Olry A, Grosjean J, Hehn et *al.*, Scopoletin 8-hydroxylase: a novel enzyme involved in coumarin biosynthesis and iron-deficiency responses in Arabidopsis. *J. Exp. Bot*, 2018, 10.1093/jxb/ery005.
18. Qian G S, Wang Q, Leung K S Y, Qin Y., Zhao, Z et *al.*, Quality assessment of Rhizoma et Radix Notopterygii by HPTLC and HPLC fingerprinting and HPLC quantitative analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal*, 2007, 44, 812–817.
- 19 Bourgaud F, Olry A, Hehn A, Recent advances in molecular genetics of furanocoumarin synthesis in higher plants, 2014, *Recent Adv. Redox Act. Plant Microb. Prod*, 2014, 363–375.
- 20 Lei L, Xue Y, Liu Z, Peng S, He Y et *al.*, Coumarin derivatives from Ainsliaea fragrans and their anticoagulant activity, *Sci. Rep*, 2015, 10.1038/srep13544.
- 21 Uto T, Tung, N H, Taniyama R, Miyanowaki T, Morinaga O, Shoyama Y, Anti-inflammatory Activity of Constituents Isolated from Aerial Part of *Angelica acutiloba* Kitagawa, *Phytother. Res*, 2015, **29**, 1956–1963.
- 22 Zou Z, Xi W, Hu Y, Nie, C, Zhou Z, Antioxidant activity of Citrus fruits, *Food Chem*, 2016, **196**, 885–896.
- 23 Xie Q, Li S X, Liao D F, Wang W, Tekwani B, Huang, HY et *al.*, Bio-pesticidal and Antimicrobial Coumarins from *Angelica dahurica* (Fisch. Ex Hoffm), *Rec. Nat. Prod*, 2016, **10**, 294–306.
- 24 Robl M, Robl R, Marinoni L P, Abagge K T, Carvalho V O, Assemble the puzzle: bizarre-looking lesions, *Arch. Dis. Child*, 2013, **98**, 915.
- 25 Paul M D, Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, <https://www.amazon.fr/Medicinal-Natural-Products-Biosynthetic-Approach/dp/0470741678>, 2018.
- 26 Conforti F, Marrelli M, Menichini F, Bonesi M, Statti G et *al.*, Natural and Synthetic Furanocoumarins as Treatment for Vitiligo and Psoriasis, *Curr. Drug Ther*, 2009,**4**, 38–58.
- 27 Bailey J E, toward a science of metabolic engineering. *Science*, 1991, **252**, 1668–1676.
- 28 Bailey D G, Malcolm J, Arnold O, David Spence J, Grapefruit juice–drug interactions, *Br. J. Clin. Pharmacol*, 1998, **46**, 101–110.
- 29 Paine M F, Widmer W W, Hart H L, Pusek S N, Beavers K L et *al.*, A furanocoumarin-free grapefruit juice establishes furanocoumarins as the mediators of the grapefruit juice-felodipine interaction, *Am. J. Clin. Nutr*, 2006, **83**, 1097–1105.
- 30 Dugrand A, Olry A, Duval T, Hehn A, Froelicher Y, Bourgaud F, Coumarin and furanocoumarin quantitation in citrus peel via ultraperformance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS), *J. Agric. Food Chem*, 2013, **61**, 10677–10684.
- 31 Royer M, Larbat R, Le Bot J, Adamowicz S, and Robin C, Is the C: N ratio a reliable indicator of C allocation to primary and defence-related metabolisms in tomato?, *Phytochemistry*, 2013, **88**, 25–33.
- 32 Durand-Hulak M, Dugrand A, Duval T, Bidel L P, Jay-Allemand C, Froelicher Y, Bourgaud F, Fanciullino A L, Mapping the genetic and tissular diversity of 64 phenolic compounds in Citrus species using a UPLC–MS approach, *Ann. Bot*, 2015, **115**, 861–877.

- 33 Diar A, Enas J, Ekbal A K, Ali A S , Qualitative and quantitative investigations of furocoumarin derivatives (Psoralens) of *Haplophyllum tuberculatum* (Rutaceae), 2005, *Almustansiriya J. Pharm. Sci*,**2**,24-36.
- 34 Vialart G, Hehn A, Olry A, Ito K, Krieger C et al., A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from *Ruta graveolens* L. exhibits p-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase activity (C2' H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants, *Plant J*, 2012, **70**, 460–470
- 35 Dugrand-Judek A, Olry A, Hehn A, Costantino G, Ollitrault P, Froelicher Y, et al., The Distribution of Coumarins and Furanocoumarins in *Citrus* Species Closely Matches *Citrus* Phylogeny and Reflects the Organization of Biosynthetic Pathways, *PLOS ONE* 2015, **10**,11.
- 36 Senior J K, Potts B M, Davies N W, Wooliver R C, Schweitzer J et al., Phylogeny Explains Variation in The Root Chemistry of Eucalyptus Species, *J. Chem. Ecol*, 2016, **42**, 1086–1097.
- 37 Rizzato G, Scalabrin, E, Radaelli M, Capodaglio G, and Piccolo O, A new exploration of licorice metabolome, *Food Chem*, 2017, **221**, 959–968.
- 38 Gorai D, Jash S, Roy R. 2016, Flavonoids from *Astragalus* Genus. *Int. J. Pharm. Sci. Res*, **7**, 2732–2747.

Figure 1: Chemical structure of the coumarins and furocoumarins analysed by UPLC/MS. The numbering correspond to the numbering defined Table 2.



**Table 1:** UHPLC/MS quantification of the 27 coumarins and furanocoumarins in the stems and leaves of the three *Ruteae* species. The results are the means of three independent replicates and error represent standard deviation.

|   | <i>R. angustifolia</i> |                   | <i>R. chalepensis</i> |                    | <i>H. tuberculatum</i> |               |
|---|------------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|------------------------|---------------|
|   | Stem                   | Leaves            | Stem                  | Leaves             | Stem                   | Leaves        |
| Total coumarins and furanocoumarins (nmol/g dry matter) | 3685.2<br>±1394.8      | 3897.2<br>±1282.4 | 19731.7<br>±6027.7    | 15705.4<br>±2666.6 | 5.4<br>±1.8            | 30.9<br>±17.7 |

**Table 2:** quantitative analysis of 27 coumarins/furanocoumarins by UHPLC/MS in the 3 *Ruteae* species. The numbering of the molecules corresponds to the numbering of the chemical structures. The results are the means of three independent replicates and error represent standard deviation. N. D. = not detected, N. Q. = not quantifiable.

| Cluster             | Quantity coumarins and furocoumarins (nmol/g dry matter) | <i>R. angustifolia</i> |                  | <i>R. chalepensis</i> L. |                  | <i>H. tuberculatum</i> |               |
|---------------------|--|------------------------|------------------|--------------------------|------------------|------------------------|---------------|
|                     |  | Stem                   | Leaves           | Stem                     | Leaves           | Stem                   | Leaves        |
| Coumarin            | umbelliferon (7)   | 127.4<br>±121.9        | 60.2<br>±26.6    | 432.7<br>±159.2          | 211.2<br>±78.5   | N.D.                   | N.Q.          |
|                     | imettin (8)  | 14.5<br>±9.4           | 15.6<br>±4.6     | 79.0<br>±58.8            | 59.3<br>±19.1    | N.D.                   | N.D.          |
|                     | nidicin (19)   | N.Q.                   | N.Q.             | 127.4<br>±168.0          | 69.2<br>±19.8    | N.Q.                   | 27.8<br>±16.2 |
|                     | isourapterin (22)  | 253.5<br>±75.8         | 5.4<br>±2.6      | 16.6<br>±15.8            | 14.2<br>±3.3     | 0.9<br>±0.7            | 1.4<br>±0.7   |
|                     | isourapterin (25)  | N.D.                   | N.D.             | N.D.                     | N.D.             | N.D.                   | N.D.          |
|                     | isourapterin (27)  | 9.7<br>±4.1            | 18.8<br>±4.3     | 90.6<br>±105.5           | 62.7<br>±13.0    | 0.6<br>±0.1            | 0.3<br>±0.1   |
|                     | isourapterin (23)  | N.D.                   | N.D.             | N.D.                     | N.D.             | N.D.                   | N.D.          |
|                     | isourapterin (23)  | 445.3±1                | 112.6            | 4034.9                   | 609.8            | 0.2                    | 0.7           |
|                     | isourapterin (1)   | 96.2                   | ±36.5            | ±1281.9                  | ±184.7           | ±0.1                   | ±0.3          |
|                     | isourapterin (2)   | N.D.                   | N.D.             | ±40.3                    | ±8.7             | N.D.                   | N.D.          |
| Xanthotoxin cluster | isourapterin (4)   | 851.2<br>±251.7        | 491.1<br>±308.1  | 3050.2<br>±842.1         | 1156.1<br>±451.4 | N.D.                   | N.D.          |
|                     | isourapterin (11)  | 178.0<br>±110.6        | 225.3<br>±73.9   | 637.5<br>±299.9          | 481.1<br>±142.1  | 3.0<br>±0.7            | N.D.          |
|                     | isourapterin (10)  | N.Q.                   | N.Q.             | 314.9<br>±120.1          | 44.8<br>±64.2    | 0.7<br>±0.2            | 0.7<br>±0.4   |
|                     | isourapterin (12)  | N.D.                   | N.D.             | 2291.9<br>±530.7         | N.D.             | N.D.                   | N.D.          |
|                     | isourapterin (13)  | N.D.                   | N.D.             | 31.5<br>±26.6            | 12.3<br>±3.9     | N.D.                   | N.D.          |
|                     | isourapterin (9)   | N.D.                   | N.D.             | 382.5<br>±66.5           | 91.1<br>±53.2    | N.Q.                   | N.Q.          |
|                     | isourapterin (24)  | N.Q.                   | N.D.             | 1046.2<br>±215.7         | 801.5<br>±175.8  | N.D.                   | N.D.          |
|                     | isourapterin (14)  | N.D.                   | N.D.             | N.D.                     | N.D.             | N.D.                   | N.D.          |
|                     | isourapterin (3)   | N.D.                   | N.D.             | 36.7<br>±22.9            | 42.4<br>±32.7    | N.D.                   | N.D.          |
|                     | isourapterin (5)   | 963.8<br>±286.5        | 1332.7<br>±326.7 | 4978.5<br>±687.2         | 4262.2<br>±55.1  | N.Q.                   | N.Q.          |
| Bergapten cluster   | isourapterin (15)  | N.D.                   | N.D.             | N.D.                     | N.D.             | N.Q.                   | N.D.          |
|                     | isourapterin (20)  | N.D.                   | N.D.             | N.D.                     | N.D.             | N.D.                   | N.D.          |
|                     | isourapterin (21)  | 285.6<br>±104.9        | 563.3<br>±160.1  | 1954.1<br>±454.6         | 1976.7<br>±300.1 | N.D.                   | N.D.          |
|                     | isourapterin (26)  | N.Q.                   | N.Q.             | 876.1<br>±98.9           | 1072.0<br>±417.7 | N.D.                   | N.D.          |
|                     | isourapterin (16)  | 191.6<br>±75.6         | 471.2<br>±143.5  | 1640.9<br>±279.2         | 2208.9<br>±246.4 | N.D.                   | N.D.          |
|                     | isourapterin (17)  | 253.5±7                | 452.8            | 1889.4                   | 1863.9           | N.D.                   | N.D.          |
|                     | isourapterin (17)  | 5.8                    | ±152.3           | ±227.5                   | ±273.1           | N.D.                   | N.D.          |
|                     | isourapterin (18)  | 45.0<br>±17.9          | 110.3<br>±29.5   | 609.3<br>±152.6          | 520.2<br>±88.5   | N.D.                   | N.Q.          |

**Développement d'outils moléculaires et cellulaires pour générer des variétés de Pomelo « Star Ruby » ne produisant pas de furocoumarines**

Les furocoumarines sont des composés phénoliques impliqués dans la défense contre les herbivores. Ces molécules sont majoritairement décrites dans quatre familles botaniques, notamment les *Rutaceae*, dont font partie les agrumes. Ces molécules sont phototoxiques ce qui peut poser des problèmes pour leur utilisation comme par exemple en cosmétique ou en phytothérapie. D'autre part, en cas d'ingestion par exemple *via* la consommation de jus de certains agrumes, elles ont responsables de l'inhibition d'enzymes de détoxification comme le CYP3A4 humain. Cela peut conduire à des surdosages médicamenteux connus sous le nom d'Effet Pomelo.

Ce travail de thèse a consisté à réfléchir et à développer, des outils qui permettront de générer de manière ciblée des variétés de pomelo qui ne produisent plus de furocoumarines.

Nous avons abordé l'ensemble des étapes essentielles pour la mise en place d'une stratégie global : i) des méthodes reproductibles ont été développées pour la production de protoplastes et de cultures cellulaires de pomelo Star Ruby ; ii) des conditions de transformation de protoplastes par électroporation ont également été mises au point ; iii) finalement, pour inhiber de manière spécifique la voie de biosynthèse des furocoumarines, nous avons choisi de mettre en œuvre une approche d'édition de génome en utilisant une méthodologie CRISPR/Cas9. La mise au point de la méthode a été réalisée avec un gène codant pour une umbelliferone 6-diméthylallyl transférase. Les résultats obtenus indiquent que la stratégie est envisageable.

Pour renforcer la stratégie CRISPR/Cas9, nous avons mis en œuvre une démarche d'identification de gènes cibles additionnels. En utilisant une approche de data mining de bases de données génomiques et transcriptomiques nous avons identifié 18 séquences candidates, potentiellement impliquées dans la voie de biosynthèse des furocoumarines. L'expression hétérologue des protéines correspondantes et leur caractérisation fonctionnelle a permis de montrer que CYP706J12 est en mesure de métaboliser l'hérniarine, une coumarine. Ce résultat apporte des éléments pour émettre des hypothèses sur l'évolution convergente de la synthèse des coumarines et des furocoumarines chez les végétaux supérieurs.

**Mot clés :** Furocoumarines, *Citrus*, *Citrus paradisi*, effet pomelo, cytochrome P450, édition génomique ciblé, CRISPR/Cas9, protoplastes, amélioration végétale, évolution convergente.

**Development of molecular and cellular tools to generate Star Ruby grapefruit varieties non producing furanocoumarins**

Furanocoumarins are phenolic compounds involved in defense against herbivores. These molecules are mainly described in four botanical families. *Rutaceae*, one of those families, includes *Citrus* species. Furanocoumarins are phototoxic compounds, which can be problematic for their use in cosmetics or in phytotherapy. Furanocoumarin ingestion via citrus juice consumption, may inhibit human enzymes of detoxification, such as human CYP3A4. This can lead to drug overdoses known as the "Grapefruit Juice Effect".

This work consisted in the development of tools that will allow to generate new varieties of pomelo that no longer produce furanocoumarins by targeted genome edition.

We have covered the essential steps for the implementation of a global strategy: i) reproducible methods have been developed for the production of protoplasts and cell cultures of Star Ruby grapefruit; ii) conditions for protoplast transformation by electroporation have also been developed; iii) finally, to specifically inhibit the furanocoumarin biosynthetic pathway, we chose to implement a genome editing approach using a CRISPR / Cas9 methodology. The development of the method was carried out with a gene encoding umbelliferone 6-dimethylallyltransferase. The results obtained indicate that the strategy is feasible.

To strengthen the CRISPR / Cas9 strategy, we implemented a method to identify additional target genes. Using a data mining approach of available genomic and transcriptomic databases we identified 18 candidate sequences potentially involved in the furanocoumarin biosynthetic pathway. Heterologous expression of the corresponding proteins and their functional characterization made it possible to show that CYP706J12 is able to metabolize herniarin (a coumarin). This result provides elements to hypothesize about the convergent evolution of coumarin and furanocoumarin synthesis in higher plants.

**Keywords:** Furanocoumarins, *Citrus*, *Citrus paradisi*, Grapefruit Juice Effect, Cytochrome P450, targeted genomic edition, CRISPR/Cas9, protoplasts, plant improvement, convergent evolution.