



**HAL**  
open science

# Implication du métabolisme carboné pour une production différentielle d'huile chez les plantes oléagineuses-Lin : modélisation des systèmes

Sébastien Acket

► **To cite this version:**

Sébastien Acket. Implication du métabolisme carboné pour une production différentielle d'huile chez les plantes oléagineuses-Lin : modélisation des systèmes. Autre. Université de Technologie de Compiègne, 2015. Français. NNT : 2015COMP2168 . tel-01153183

**HAL Id: tel-01153183**

**<https://theses.hal.science/tel-01153183>**

Submitted on 19 May 2015

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

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

Par **Sébastien ACKET**

*Implication du métabolisme carboné pour une production différentielle d'huile chez les plantes oléagineuses-Lin : modélisation des systèmes*

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



Soutenu le 09 janvier 2015  
**Spécialité** : Biotechnologie

D2168

# UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE

Ecole Doctorale Sciences pour l'Ingénieur  
Laboratoire CNRS FRE 3580 : Génie Enzymatique et Cellulaire

Thèse  
En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE

Spécialité : Biotechnologie

---

Sébastien Acket

IMPLICATION DU METABOLISME CARBONE POUR UNE PRODUCTION DIFFERENTIELLE D'HUILE CHEZ  
LES PLANTES OLEAGINEUSES – LIN : MODELISATION DES SYSTEMES

---

Vendredi 9 Janvier 2015

Composition du jury

ROLIN D.	Professeur à l'Université de Bordeaux Ségalen	Rapporteur
ZACHOWSKI A.	Directeur de Recherche au CNRS	Rapporteur
LUCAU A.	Maître de Conférences à l'Université des Sciences de Lille 1	Examinatrice
MOTTELET S.	Maître de Conférences à l'Université de Technologie de Compiègne	Examineur
VAN WUYTSWINKEL O.	Professeur à l'Université de Picardie Jules Verne	Examineur
VILLON P.	Professeur à l'Université de Technologie de Compiègne	Directeur
THOMASSET B.	Directrice de Recherche au CNRS	Directrice

*Phrase fétiche de Daniel Thomas : "ce n'est pas parce qu'une recherche ne sert à rien qu'elle est fondamentale"*

*Phrase fétiche de Daniel Thomas : "en recherche, avant même d'être bon, il faut être différent"*



## REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements au Pr. Karsten Haupt, directeur du laboratoire de Génie Enzymatique et Cellulaire (FRE CNRS 3580), de m'avoir accueilli pour effectuer mes travaux de thèse.

J'exprime ma plus grande reconnaissance au Pr Rolin, Dr Zachowski, Dr Lucau, Pr Van Wuytswinkel et Dr Mottelet pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier le Dr Thomasset et le Pr Villon pour leur confiance en me confiant ces travaux de recherche, leurs écoutes, les échanges scientifiques et surtout leurs grandes disponibilités durant cette thèse.

Un grand merci aux acteurs du programme PIVERT et notamment à ceux impliqués dans le programme 4 "Lipid metabolism : from plants to microorganisms" pour les échanges scientifiques et leurs aides.

Un grand merci au Dr Stéphane Mottelet et à Franck Merlier pour leurs aides précieuses, le temps qu'ils m'ont accordé et leurs disponibilités.

J'adresse également ma reconnaissance aux membres du laboratoire. Un merci tout spécial à Valérie, Zeinab, Amel, Abdel, Natacha, Mohamed, pour leurs différents conseils, leur attention, leur aide, leur gentillesse et leur bonne humeur au quotidien. **Au souvenir du PR. Daniel Thomas, merci de nous avoir donné envie, on ne t'oubliera jamais.**

Je remercie également Mme Catherine Rayon, Mr Jean-Marc Domon, Mme Karine Pageau, Mme Sophie Bouton, qui m'ont permis de découvrir, d'appréhender, et de me donner goût au travail de recherche lors de mes stages de Master 1 et Master 2. Je leur renouvelle ma reconnaissance pour leur aide, leur conseil, leur gentillesse.

J'adresse également toute ma gratitude à mes amis proches (le noyau dur, Tonton RORO, Gauthier L, Lauranne D, David D, Maïram S), mais également à mes parents, mon frère pour m'avoir toujours soutenu dans mes choix car sans eux rien n'aurait été possible. Un grand remerciement à Crapusia pour son amour et son aide au quotidien.

**LISTE DES ABREVIATIONS**

°C : degré Celsius	CHI : chalcone isomérase
€ : euro	CHS : chalcone synthase
/ : par	Cm : centimètre
2PGA : acide 2-phosphoglycérique	CoA : Coenzyme A
3PGA : acide 3-phosphoglycérique	CPG : chromatographie en phase gazeuse
AA : acide organique	CPT : 1,2-sn-diacylglycérol choline phosphotransférase
ACCase: acétyl-CoA carboxylase	CT : carboxyltransférase
ACP : acyl Carrier Protein	Cy3 : cyanine 3
ADN : acide désoxyribonucléique	Cy5 : cyanine 5
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire	DAG: diacylglycérol
ADP : adénosine diphosphate	DAGAT : diacylglycérol acyltransférase
AG : acide gras	DFR : dihydroflavonol-4-reductase
ANR : anthocyanidin reductase	DHAP : 3-désoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate
ARN : acide ribonucléique	DCPIP : 2,6-dichloro phénol indo phénol
ARNm : ARN messenger	DHA : acide docosahexaénoïque
ATP : adénosine triphosphate	dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate
AX : arabinoxylanes	DO : densité optique
BC : biotine carboxylase	EAR: énoyl-ACP réductase
BCCP : biotine carboxyl carrier protein	EC-MS : électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse
Bq : becquerel	ED : Entner-Doudoroff
BSA : bovin serum albumin	EDTA : acide éthylène diamine tétracétique
C16:0 : acide palmitique	EI : ionisation par impact électronique
C18:0 : acide stéarique	EPA : acide eicosapentaénoïque
C18:1 : acide oléique	ESI : Electrospray ionization
C18:2 : acide linoléique	EST : expressed short tag
C18:3 : acide linoléique	FAD : fatty acid desaturase
CE : condensing enzyme	FAS : fatty acid synthase
CI : ionisation par impact chimique	

FAT : fatty acid thioesterase	LEU : leucine
FLS : flavonol synthase	LPAAT : acide lyso phosphatidique acyltransférase
F3H : flavonol 3-hydroxylase	MAT : S-malonyltransférase
F3'H : flavonol 3'-hydroxylase	MBDSTFA : N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyl-trifluoroacetamide
g/100g : gramme pour 100 grammes	MDH : malate déshydrogénase
GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse	MF : matière fraîche
GOGAT : glutamate synthase	MFA : Metabolic Flux Analysis
GS : glutamine synthétase	mg : milligramme
GST : glutathione S-transferase	ML : matière lyophilisée
GT : glycosyltransférase	mm : millimètre
G3P : glycérol-3-phosphate	MS : matière sèche
G6P : glucose 6-phosphate	m/z : masse sur charge
G3PAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase	NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
G6PDH : glucose 6-phosphate déshydrogénase	NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ha : hectare	NaOH : hydroxyde de sodium
HAD : hydroxyacyl-ACP déshydratase	NIST : National Institute of Standards and Technology
HDG : herbacétine diglucoside	OA : acide organique
HCl : acide chlorhydrique	OMT : méthyltransférase
HK : hexokinase	OoxPPP : voie oxydative des pentoses phosphates
HMG : acide hydroxyméthylglutarique	PAL : phénylalanine ammoniac lyase
JAF: jours après floraison	PDH : pyruvate déshydrogénase
KAR : cétoacyl-ACP réductase	PC : phosphatidylcholine
KAS : cétoacyl-ACP synthase	PCCase : propionyl CoA carboxylase
Kb : kilo bases	PCR : réaction de polymérisation en chaîne
kDa : kilo Dalton	PDC : pyruvate décarboxylase
KOH : hydroxyde de potassium	PDCT : phosphatidylcholine : diacylglycérol choline phosphotransférase
KS : domaine de la cétoacyl synthase	
LC-MS : chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse	
LDOX : leucoanthocyanidin dioxygénase	

PDAT : phospholipide diacylglycérol acyltransférase	SuSY : saccharose synthase
PE : phosphatidyléthanolamine	TA: transaldolase
PEP : phosphoénoil pyruvate	TAG : triacylglycérol
PEPC : phosphoénoilpyruvate carboxylase	TE : acyl-ACP thioestérase
PGAM : 2,3-bisphosphoglycérate-independent phosphoglycérate mutase	TFA : trifluoroacetic acid
PGK : phosphoglycérate kinase	THR : thréonine
PGM : phosphoglucomutase	TK : transkétolase
6PGDH : 6-phosphogluconate déshydrogénase	TMAH : tétra méthyl ammonium hydroxide
PHE : phénylalanine	TP : triosephosphate
PLR : pinorésinol laricirésinol réductase	TPT : translocateurs trioses phosphate / phosphate
PRPP : 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate	Tris : tris hydroxyméthyl disphosphate
pG6P : glucose 6-phosphate plastidique	[U-13C] : uniformément marqué en 13C
pP5P : ribulose 5-phosphate plastidique	[1-13C <sub>1</sub> ] glucose : glucose marqué d'un carbone 13 sur le carbone n°1
PPT : translocateur phosphoénoil pyruvate / phosphate	[2-13C <sub>1,2</sub> ] glucose : glucose marqué de deux carbones 13 sur les carbones n°1 et n°2
PVP : polyvinyl pyrrolidone	
q/ha : quintaux par hectare	
QQQ : triple quadrupole	
QTOF : Quadrupole-Temps de vol	
RE : réticulum endoplasmique	
RGI : rhamnogalacturonane de type I	
RMN : résonance magnétique nucléaire	
rpm : rotation par minute	
Rubisco : ribulose-1,5-diphosphate carboxylase/oxygénase	
SAD : stearoyl-acyl protein desaturase	
SD : sécoisolaricirésinol déshydrogénase	
SDG : sécoisolaricirésinol di-glucoside	
SDS : sodium dodecyl sulfate	
SECO : sécoisolaricirésinol	

## TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>II</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>5</b>
Chapitre 1 : Le Lin, une plante oléagineuse.....	5
1.1. Introduction au modèle d'étude.....	5
1.2. Biologie du lin.....	10
1.3. Composition de la graine de lin mature. ....	13
Chapitre 2 : Synthèse des composés de réserves. ....	24
2.1. Origine des carbones et de l'azote pour la synthèse des acides gras dans les graines de lin. ....	25
2.2. Métabolisme lipidique chez les plantes oléagineuses.....	34
2.3. La biosynthèse des composés glucidiques.....	43
2.4. La synthèse des acides aminés. ....	48
2.5. Biosynthèse des composés secondaires, les polyphénols.....	53
Chapitre 3 : Rôle des facteurs de transcription et contrôle physiologiques de l'accumulation des huiles dans les graines.....	60
3.1. Le rôle des facteurs de transcription dans l'accumulation d'huile.....	60
3.2. Contrôle physiologique de l'accumulation des huiles. ....	71
<b>OBJECTIFS DE RECHERCHE.....</b>	<b>78</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>79</b>
1. Matériel végétal.....	79
1.1. Lignées de lin sélectionnées. ....	79
1.2. Conditions de culture en serre.....	79
2. Méthodes.....	80
2.1. Caractérisation phénotypique du matériel végétal. ....	80
2.2. Caractérisation biochimique des embryons/téguments/graines des lignées de lin sélectionnées. ....	81
<b>2.3. Analyse Transcriptomique.....</b>	<b>92</b>
<b>2.4. Analyse des flux métaboliques au carbone 13.....</b>	<b>98</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>	<b>113</b>
Chapitre 1 : Caractérisations phénotypique et biochimique des lignées de lin .....	113

1.1.	Caractérisation phénotypique des lignées de lin.....	113
1.2.	Caractérisation biochimique des graines de lin.....	116
1.3.	Synthèse des huiles et des acides gras dans les graines matures de lin. ....	123
1.4.	Localisation et synthèse des composés dans les graines de lin.....	126
1.5.	Bilan des analyses biochimiques des graines des deux lignées de lin. ....	138
Chapitre 2 : Analyses transcriptomiques des embryons et des téguments des lignées de lin <i>Astral</i> et <i>238</i> au cours de l'embryogenèse.....		141
2.1.	Analyse globale des résultats de transcriptomique.....	142
2.2.	Expression des gènes dans les téguments de lin âgés de 24 JAF. ....	143
2.3.	Expression des ESTs dans les embryons de lin âgés de 24 JAF.....	155
2.4.	Bilan des analyses transcriptomiques dans les embryons et les téguments des deux lignées de lin.....	171
Chapitre 3 : Analyse des flux métaboliques dans les embryons des lignées de lin <i>Astral</i> et <i>238</i> .....		173
3.1.	Optimisation de la culture des embryons, des extractions et de l'analyse des métabolites. ....	174
3.2.	Analyse préliminaire des flux métaboliques dans les embryons de lin.....	194
3.3.	Comparaison des flux métaboliques dans les embryons des deux lignées sélectionnées. ....	222
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>		<b>234</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>		<b>A</b>
<b>ANNEXES .....</b>		<b>W</b>
<b>TABLE DES FIGURES .....</b>		<b>III</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>		<b>LLL</b>

## **INTRODUCTION GENERALE**

Les plantes oléagineuses ont la particularité d'accumuler majoritairement des huiles dans leurs graines et synthétisées par des mécanismes complexes. Depuis les 30 dernières années, les oléagineux connaissent un développement spectaculaire (production multipliée par 9 depuis 1964), aussi bien au niveau de la production des graines, des huiles, des tourteaux que des échanges mondiaux. Ce développement spectaculaire est dû à la volonté de remplacer des produits dérivés du pétrole (carburant, lubrifiant, solvants) par des composés renouvelables et biodégradables, mais lié également à l'accroissement de la démographie engendrant des besoins alimentaires de plus en plus important.

La composition en acides gras de l'huile des plantes oléagineuses est très variable à la fois entre les espèces et au sein des espèces. La longueur, le degré d'insaturation, le nombre et le type de groupements fonctionnels sur la chaîne carbonée influencent les propriétés des huiles (Sharma et Chauhan, 2012). Ces différences de compositions conditionnent directement l'utilisation de ces huiles à des fins alimentaires ou industrielles.

A l'échelle mondiale, l'huile de palme est l'huile majoritairement produite et consommée (25 %) devant l'huile de soja (24 %), l'huile de colza (12 %) et l'huile de tournesol (7 %). Ces huiles bien souvent saturées présentent des rapports oméga-3/oméga-6 trop faible (1/30) par rapport aux recommandations de la FAO (1/4). Depuis quelques années, les instances gouvernementales ont mis en place des directives européennes visant à augmenter les teneurs en oméga-3 dans les préparations culinaires (Arrêté du 12 juillet 2010; ANSES 2011).

L'huile de lin est une huile composée majoritairement d'acide linoléique, un oméga-3. Cette huile connaît un nouvel engouement de la part des industriels de l'agroalimentaire et est une bonne candidate permettant de réajuster les rapports oméga-6/oméga-3 dans la formulation d'huiles alimentaires mixtes et dans les préparations culinaires. Pour répondre à cette demande croissante, il est nécessaire de sélectionner des cultivars producteurs d'huile de la qualité demandée. Pour cela, des connaissances sur les mécanismes de synthèse et d'accumulation de ces huiles dans les graines de lin sont à acquérir. Cette acquisition de connaissance passe par une compréhension approfondie du métabolisme cellulaire impliqué dans le remplissage des graines.

De nombreuses études ont été effectuées pour comprendre comment les synthèses sont organisées dans les graines de colza, de soja, d'*Arabidopsis thaliana*, de tournesol et de maïs, mais très peu pour le lin (Schwender *et al.*, 2003 ; Schwender *et al.*, 2004 ; Sriram *et al.*, 2004 ; Schwender *et al.*, 2006 ; Alonso *et al.*, 2007 ; Lyer *et al.*, 2008 ; Allen *et al.*, 2009 ; Lonien et Schwender, 2009 ; Alonso *et al.*, 2010). Les analyses biochimiques ont permis de définir les lieux de synthèse et d'accumulation des acides gras, des protéines, des sucres pour chaque plante étudiée. Par des analyses transcriptomiques réalisées sur des graines et/ou embryons en développement, les gènes impliqués dans ces synthèses et ceux régulant certaines voies de biosynthèse (huile, acides gras, acides aminés, métabolites secondaires, ...) ont été identifiés (Dussert *et al.*, 2013). Leurs expressions différentielles en fonction du type de plantes, du type de production (WRINKLED1) ont pu être mises en évidence. Les études de marquage isotopique (RMN, Spectro...) effectuées avec des embryons en développement ont servi à montrer comment s'effectuaient les synthèses dans les graines en mesurant les flux métaboliques dans les réseaux indiquant (i) l'importance des réactions du métabolisme carboné dans la synthèse et l'accumulation de ces huiles et (ii) les redirections pouvant être observées dans certaines lignées végétale (Schwender *et al.*, 2003 ; Schwender *et al.*, 2004 ; Sriram *et al.*, 2004 ; Schwender *et al.*, 2006 ; Alonso *et al.*, 2007 ; Lyer *et al.*, 2008 ; Allen *et al.*, 2009 ; Lonien et Schwender, 2009 ; Alonso *et al.*, 2010).

Ces travaux ont aussi montré que chaque espèce végétale peut avoir sa propre particularité. En effet, des différences de précurseurs pour la synthèse des composés de réserves, des différences de voies conduisant à la synthèse des acides gras et de l'origine des cofacteurs nécessaires à la synthèse et à l'accumulation des huiles ont été reportées entre les embryons de colza, d'*Arabidopsis thaliana* et de tournesol. Ces analyses sont peu répertoriées pour le lin bien qu'il s'agisse d'une des seules plantes qui accumule de fortes teneurs en oméga-3. Les travaux de thèse de Troufflard en 2004 ont permis de montrer que le lin est un modèle original par rapport au colza ou *Arabidopsis thaliana* puisque les précurseurs nécessaires à la synthèse des huiles sont différents.

Après avoir mis en évidence des différences entre les différentes plantes et le lin, des travaux ont été entrepris pour identifier les particularités du lin en travaillant sur des lignées différentes productrices de plus ou moins d'huile et de plus ou moins d'acides gras polyinsaturés. Les travaux préliminaires réalisés au sein de notre laboratoire ont permis de

mettre en place les outils nécessaires à une étude de génomique fonctionnelle (couplage transcriptomique, fluxomique) (Koubaa, 2012). Ainsi, des différences ont été observées dans l'analyse de ces lignées mais un certain nombre de problèmes ont pu être identifiés:

- le travail sur la graine entière n'a pas permis de cibler les différences au niveau des embryons, lieu de synthèse et d'accumulation des huiles (transcriptomique).

- le travail n'a pas permis de déterminer précisément les dates où état métabolique et état isotopique stationnaire pouvaient être atteints et pré-requis pour l'obtention des flux métabolique.

Dans ce contexte général, les questions qui ont été soulevées par ce travail concernent :

- comment le lin accumule ses réserves et plus particulièrement son huile?
- le lin se comporte-t-il comme une plante oléagineuse "modèle" type Arabidopsis/colza ou plante "mixte" soja/maïs pour l'accumulation de ses huiles?

Mon travail de thèse a porté sur l'étude de « l'implication du métabolisme carboné pour une production différentielle d'huile chez le lin » de façon à approfondir les mécanismes de synthèse et d'accumulation des huiles dans les graines de lin et d'identifier les différences par rapport à d'autres graines. Ce travail a porté sur deux lignées de lin accumulant des teneurs en huile significativement différentes dans leurs graines de manière à comprendre les mécanismes de synthèse et de régulation de la teneur en huile dans les graines de lin. Sur deux lignées de lin accumulant des teneurs en huile similaire mais des teneurs en C18:3 différentes, l'étude des mécanismes d'accumulation et de la régulation de la synthèse du C18:3 a été abordée. Dans le cadre de cette thèse, seuls, les résultats concernant les teneurs en huile seront présentés. Pour répondre à ces objectifs, nous avons utilisé et développé les techniques « omics » au niveau du laboratoire.

Le travail de thèse a porté principalement sur :

- la caractérisation des lignées sélectionnées par l'étude des différences phénotypiques et biochimiques des graines des deux lignées de lin (chapitre 1). Ces données nous ont permis de définir les différences d'accumulation entre les deux lignées de lin et d'émettre des hypothèses expliquant ces différences d'accumulation. Ce travail a été

effectué séparément sur les embryons et les téguments de manière à mieux cibler les lieux de modifications et limiter les interactions.

- l'analyse transcriptomique des embryons en développement des lignées sélectionnées (chapitre 2). Cette étude va nous permettre de mettre en évidence des différences d'expression de gènes entre les deux lignées de lin. Cette étude réalisée à différents stades de développement sur les téguments et les embryons servira à identifier des gènes candidats qui pourraient être impliqués dans l'accumulation différentielle des huiles dans les deux lignées sélectionnées.

- l'analyse des flux métabolique dans les embryons des deux lignées de lin (chapitre 3). Cette analyse aura pour objectif de comprendre comment sont organisées les synthèses dans les embryons de lin, d'identifier les flux majoritaires impliqués dans la synthèse des acides gras (précurseurs nécessaires, ...), de comprendre les réseaux métaboliques conduisant à une optimisation de la synthèse de ces acides gras et lipides afin de définir les points clés conduisant à l'accumulation des huiles dans les graines de lin.

La discussion portera sur :

- les différences affichées entre le lin et les autres plantes,
- les relations génomiques et fluxomique des deux lignées de lins étudiés,
- les questions re-posées suite à ces travaux.

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE 1 : LE LIN, UNE PLANTE OLEAGINEUSE

#### **1.1. Introduction au modèle d'étude.**

##### **1.1.1. Le lin.**

Le lin est une plante annuelle herbacée faisant partie de la famille des Linacées. Cette famille présente 200 espèces de lin dont la plus connue, la plus cultivée et la plus répandue est *Linum usitatissimum* (Beard et Comstock 1980).

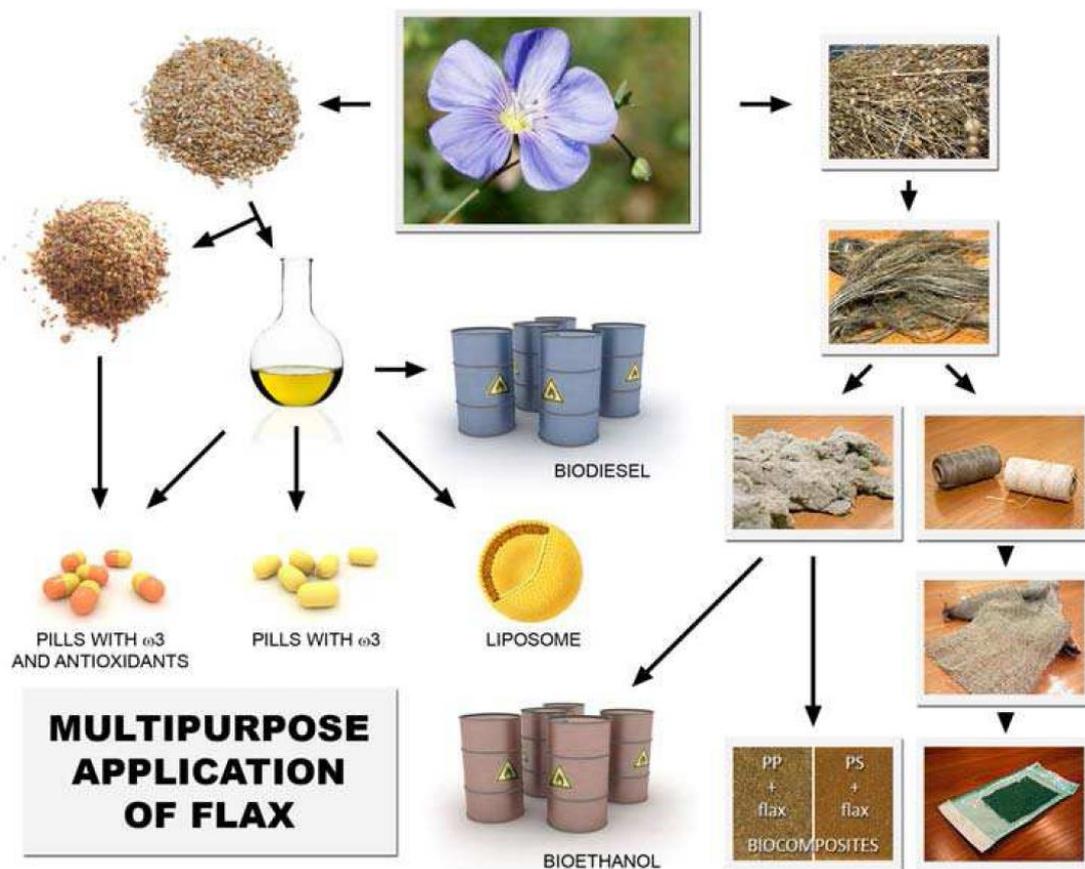
La culture du lin est l'une des plus anciennes (Age de Pierre) soit il y a plus de 2,5 millions d'année. En effet, le lin est une des premières plantes domestiquées par l'homme, notamment pour ses fibres et leurs utilisations vestimentaires et ses graines utilisées en alimentaire. Toutefois, l'utilisation de ces fibres de lin a subi une réelle diminution au cours du temps au détriment d'une autre culture, plus économique et donc plus rentable, le coton (Jhala et Hall, 2010). En effet, l'extraction des fibres de lin fut et reste toujours un problème car tributaire de la qualité du rouissage dépendant fortement des conditions climatiques et de l'action des microorganismes du sol. Le contrôle suivi de ces opérations a conduit à une augmentation du rendement d'extraction des fibres. La qualité des fibres a ainsi pu être améliorée et leur plus grande finesse, leur robustesse et leur élasticité moindre les rendent plus compétitives que les fibres de coton pour certaines applications industrielles (Jhala et Hall, 2010).

Le développement industriel a conduit à la sélection de deux familles de lin, l'une pour la culture des graines riches en huile poly-insaturée et plus particulièrement en acide linoléique, un oméga-3 (lin oléagineux), et l'autre pour ses fibres contenues dans ses tiges (lin "fibre") (Vaisey-Genser et Morris, 2003).

Les fibres du lin "fibre" sont valorisées dans de nombreuses applications industrielles à hautes valeurs ajoutées (**Figure 1**) notamment dans l'industrie du textile/habillement (56 % des débouchés de la fibre de lin), du linge de maison (19 % ; Institut Technique du Lin) et dans des secteurs non vestimentaire (papiers spécifiques, billets de banque, la matelasserie, isolant) et plus récemment dans le domaine des biocomposites (Lligadas *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2006 ; Alix *et al.*, 2008 ; Czemplik *et al.*, 2011 ; Wrobel-Kwiatkowska *et al.*, 2012 ; Bagheri

*et al.*, 2013 ; Dhakal *et al.*, 2013 ; Ibrahim *et al.*, 2014). Les résidus des tiges de lin peuvent présenter de futurs intérêts pour la production de bioéthanol (FitzPatrick *et al.*, 2010 ; Keijsers *et al.*, 2013 ; Moriana *et al.*, 2014).

La production mondiale de fibre de lin représente plus 200 000 tonnes de fibres par an pour 165 000 hectares de lin fibre cultivé en 2013 (USDA, 2013). La France est le premier pays producteur de lin textile avec 77 000 hectares répartis majoritairement en Haute Normandie, Picardie et Nord-Pas-de-Calais et représentant environ 96 000 tonnes de lin teillé soit 75 % de la production mondiale avec une qualité de fibre de classe N°1.



**Figure 1 : Les utilisations du lin textile et du lin oléagineux d’après Czemplik *et al.*, 2011.**

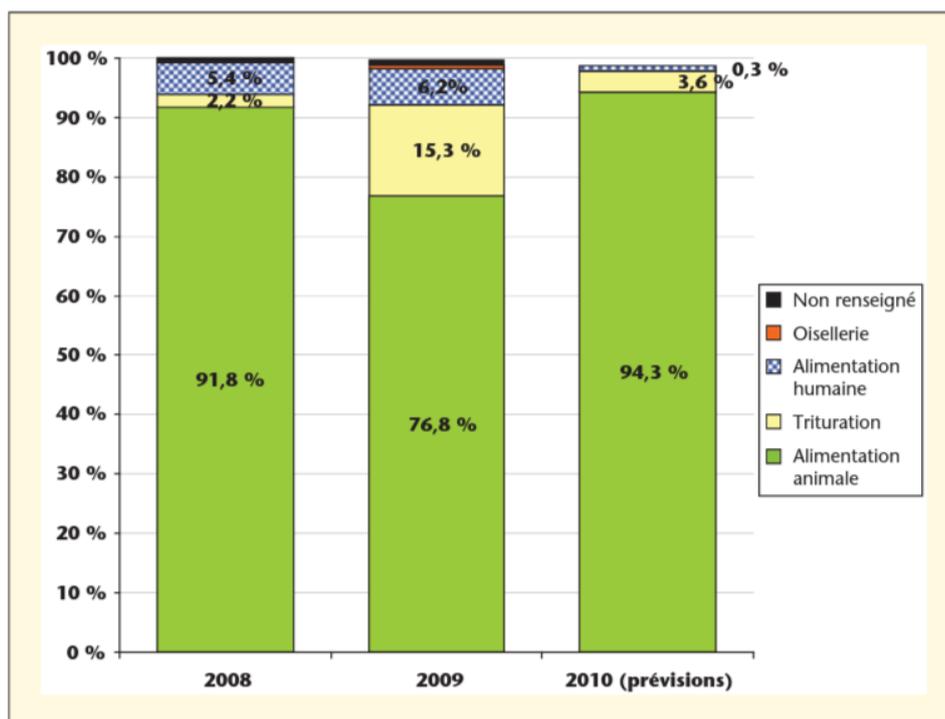
### 1.1.2. Contexte socio-économique du lin oléagineux.

Le lin est cultivé dans de nombreuses régions du monde (Amérique du Nord, Australie, Europe, Asie) et plus exactement dans 44 pays avec une production de graines de 2,52 millions de tonnes en 2013 et une augmentation de 16 % pour l'année 2013 (USDA, 2013). Le Canada est le 1<sup>er</sup> producteur mondial avec 1,3 million de tonnes de graines de lin

sur 420 milles hectares (USDA, 2013 ; Jhala et Hall 2010). La production européenne est de 103 000 tonnes avec une croissance de 4 % par an. La production de graines de lin en France représente seulement 35 000 tonnes soit 1,8 % de la production mondiale.

Cependant, cette production est moins importante que la demande européenne de graines nécessitant une importation de plus 700 000 tonnes venant principalement du Canada. Ces graines de lin sont triturées chaque année, positionnant l'Europe comme premier producteur d'huile et de tourteaux de lin au monde.

En France, les graines de lin sont utilisées majoritairement en alimentation animale (75 à 95 % ; **Figure 2**) permettant d'enrichir en oméga-3 nos aliments de consommation courante (œufs, viande, lait). De part leur haute valeur nutritionnelle et les teneurs élevées en antioxydants, les graines de lin sont également utilisées directement en alimentation humaine et dans les industries cosmétiques et pharmaceutiques (**Figure 2**).



**Figure 2 : Répartition des débouchés des graines de lin (d'après Labalette *et al.*, 2011 - Onidol/Cetiom 2010).**

L'huile de lin présente des propriétés siccatives principalement utilisées en oléochimie entrant dans la composition de vernis, peintures, encres, agents de revêtement, polymères et biocarburants (Overem *et al.*, 1999 ; Van De Mark et Sandefur 2005 ; Lligadas *et al.*, 2006 ;

Durrett *et al.*, 2008). L'obtention de ces huiles par trituration des graines reste faible (2,2 % en 2008 et 15,3 % en 2009) (Labalette *et al.*, 2011). Toutefois, l'autorisation récente de la consommation d'huile de lin en tant qu'huile vierge dans l'alimentation humaine possible (arrêté ministériel du 12/07/2010 paru suite aux avis émis par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments), pourrait permettre de nouvelles valorisations de cette huile de lin très riche en oméga-3 dans le domaine alimentaire (Anses, 2011).

### **1.1.3. Facteurs influençant la culture du lin.**

La répartition ubiquitaire du lin, lui donne un caractère endémique ne présentant pas de besoins spécifiques ou particuliers en terme de propriétés du sol (texture, structure) et de fertilisation. Toutefois, le lin n'est pas particulièrement résistant à la sécheresse ni aux fortes températures (température optimal de croissance entre 12°C et 24°C), nécessitant parfois une irrigation contrôlée (Gabiani, 2005). Le lin est donc cultivé plutôt dans des régions tempérées de climat océanique et est particulièrement bien adapté à la Picardie, à la Normandie, à la Seine Maritime et au Nord-Pas-de-Calais.

En effet, si un stress hydrique a lieu durant la floraison ou au cours du développement de la plante, une déshydratation importante de la plante provoque un retard de développement s'accompagnant d'une perte de rendement en graines pouvant aller jusqu'à plus de 40 % (Beard et Comstock, 1980 ; Huali, 2006).

Bien que la culture du lin au champ nécessite peu d'intrants NPK et de fongicides, elle génère environ 100 € d'économie/ha par rapport à d'autres cultures comme le blé et le colza. Cette culture ne représente que 1 % des terres d'oléagineux dans le monde. Une des principales raisons est le montant beaucoup moins élevé des marges brutes (193 € de moins/ha) que celui obtenu pour les cultures de blé et de colza (Labalette *et al.*, 2011). Cette faible marge brute est notamment due à des rendements insuffisants de production de graines (20,9 q/ha) par rapport à une plante de grandes cultures.

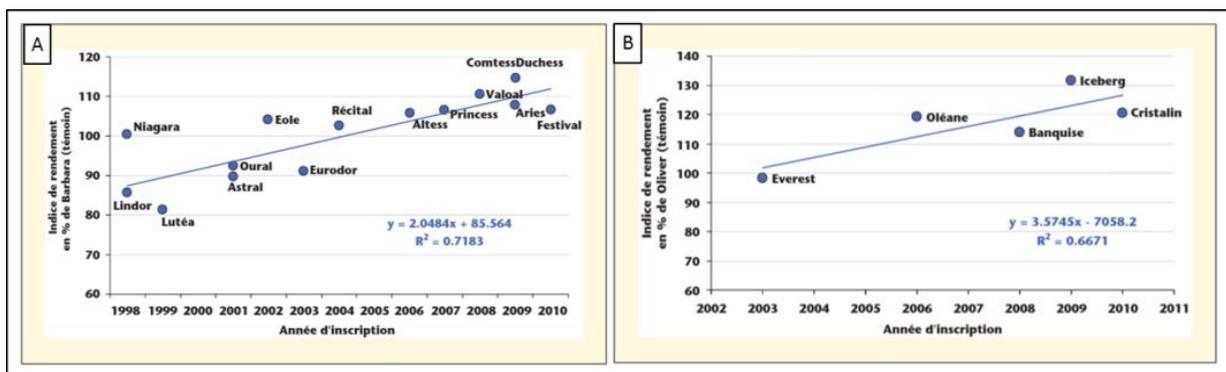
### **1.1.4. Sélection variétale et augmentation des rendements de production.**

Le développement de cultivars adaptés et présentant des teneurs élevées en huiles et des huiles riches en oméga-3/oméga-6 devient une nécessité pour répondre à la demande sociétale actuelle. Bien que des lignées de lin inscrites au catalogue ont des teneurs en huiles différentes, l'effort de sélection doit porter maintenant sur la qualité de huile (Labalette *et*

al., 2011). Le développement de graines à plus haute teneur en huile et oméga-3 va nécessiter une compréhension approfondie du métabolisme impliqué dans le remplissage des graines de lin.

Les travaux menés par les trois sélectionneurs de lin présents sur le territoire français ont conduit à des progrès génétiques majeurs en terme de rendement en graines. En effet pour 69 variétés de lin inscrites au catalogue en 2014, les progrès de sélection et d'amélioration de la conduite culturale ont permis d'être compétitif au niveau mondial. En France, le rendement en graines a été augmenté, au cours de ces 4 dernières années, pour atteindre une moyenne de 23 q/ha en comparaison de 11 q/ha rendement moyen mondial (Onidol/Cetiom, 2010). De plus, ces progrès ont permis d'augmenter les rendements en graines de 2,5 % par an et par hectare pour le lin de printemps et de de 2,5 % par an et par hectare pour le lin d'hiver (**Figure 3**). Afin d'améliorer ce rendement il sera nécessaire de développer des connaissances sur la conduite des cultures de lin de manière à mieux conseiller les agriculteurs (densité de semis adaptée, usage de régulateur de croissance, désherbages chimiques, gestion de l'azote, contrôle des pathogènes, contrôle des stress...).

La demande croissante en oméga-3 a également conduit les sélectionneurs à sélectionner leurs variétés en prenant en compte ce nouveau paramètre dans leur schéma de sélection. Cet effort a permis de développer des cultivars avec plus de 66 % d'oméga-3 dans leur huile notamment chez les lins de printemps.



**Figure 3 : Estimation du progrès génétique sur le facteur de rendement de production (Labalette et al., 2011 - Onidol/Cetiom 2010).**

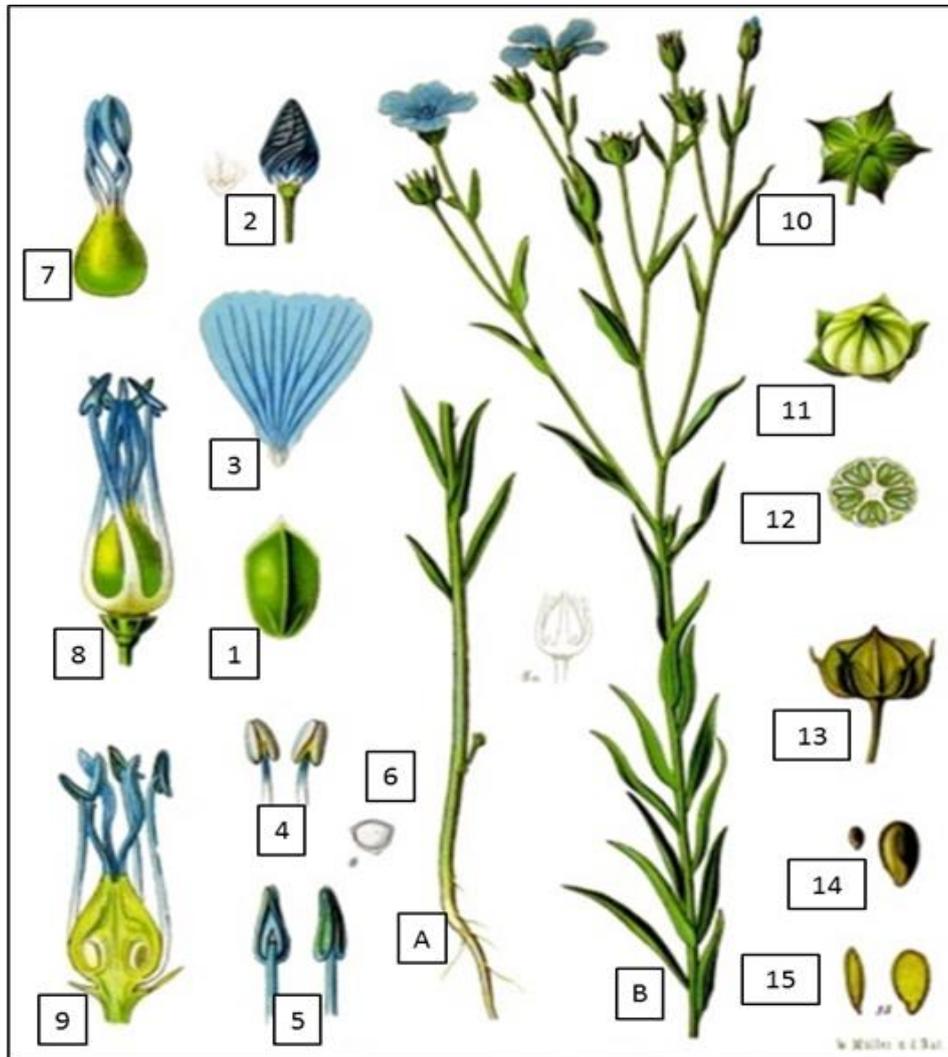
A : lin de printemps

B : lin d'hiver

## 1.2. Biologie du lin.

### 1.2.1. Généralités

Le lin est une espèce herbacée annuelle d'une hauteur variant de 90 à 120 cm selon les génotypes, tige unique avec des feuilles sessiles, une inflorescence en racème ou en cyme.



**Figure 4 : Planche botanique du lin cultivé (*Linum Usitatissimum*), domaine public.**

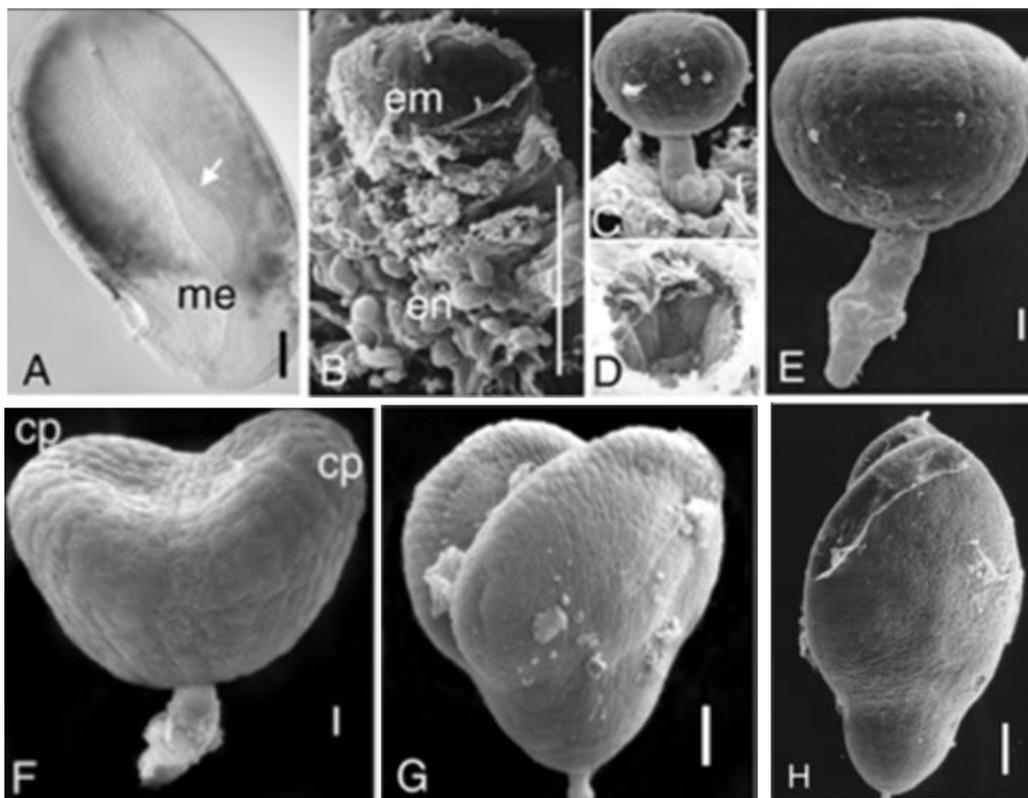
A, B : plante ; 1 : sépales ; 2 : bourgeon sans calice ; 3 : pétale ; 4 et 5 : étamines ; 6 : grain de pollen ; 7 : pilon avec 5 colonnes ; 8 et 9 : Fleur sans calice, corolle et étamines ; 10, 11 : fruit non mur (capsule) ; 12 : coupe transversale d'une capsule de lin ; 13 : fruit mature ; 14 : graine de lin brune ; 15 : coupe longitudinale des graines de lin brune.

*Linum usitatissimum* est une plante hermaphrodite et hypogyne présentant 5 sépales, 5 pétales bleus, 5 étamines et 5 carpelles (**Figure 4**). Le caractère hypogyne de cette espèce entraîne une autofécondation stricte, faisant de la reproduction sexuée un événement très rare, inférieur à 2 % (Beard et Comstock 1980). Le fruit obtenu correspond à une capsule à

cinq loges, contenant au maximum dix graines (Plant Biosafety Office 1994). Si cette espèce est aussi bien répandue, c'est une des seules espèces dont les différentes variétés présentent des capsules non-déhiscentes ou semi-déhiscentes, facilitant ainsi la récolte des graines par l'homme (Beard et Comstock 1980).

### 1.2.2. Développement et maturation de la graine de lin.

Chez les graines de lin, comme toute graine d'angiosperme, la double fécondation du sac embryonnaire engendre le développement de tissus zygotiques, le zygote (2n) et le zygote accessoire (3n). Ces tissus sont protégés par des couches de cellules maternelles dérivées des cellules ovulaires. Ces couches de cellules correspondent aux téguments (interne et externe). Le développement et la maturation de la graine de lin (*Linum usitatissimum*) durent environ 50 jours et peuvent être divisés en trois étapes (Gutierrez *et al.*, 2006 ; Barvkat *et al.*, 2012) : une première étape d'embryogenèse suivie d'une étape d'accumulation des réserves et d'une étape de dessiccation (Figure 5).



**Figure 5 : Développement des embryons des graines de lin d'après Venglat *et al.*, 2011.**

A : Graine après la fécondation ; B → H : Image de microscopie électronique des embryons au cours du développement. | : 0.1 mm. B : Cellules de l'albumen (en) entourant l'embryon au début du stade globulaire (em) ; C : Embryon au début du stade globulaire ; D : Douille micropylaire ; E : Embryon au stade globulaire ; F : Embryon au stade cordiforme. cp : cotylédons en formation ; G : Embryon au stade torpille jeune ; H : Embryon au stade torpille.

#### 1.2.2.1. Embryogenèse des graines de lin.

La première étape initiée lors de la double fécondation du sac embryonnaire correspond à l'étape d'embryogenèse. Le zygote (2n) va se diviser activement puis entrer en phase de morphogenèse afin d'obtenir morphologiquement le plan d'organisation de base de la plante mature au stade torpille. Chez le lin, l'embryogenèse se déroule de 4 à 16 JAF (Barvkat *et al.*, 2012).

Après la double fécondation (**Figure 5 A**), la future graine est translucide et le sac embryonnaire est accolé au tissu ovulaire (futur tégument). La division cellulaire au niveau du zygote engendre un embryon globulaire (**Figure 5 B, C, D, E**) relié à un suspenseur de seulement 4 cellules. Au stade cordiforme (**Figure 5 F**), l'embryon se développe laissant apparaître l'hypocotyle et une radicule.

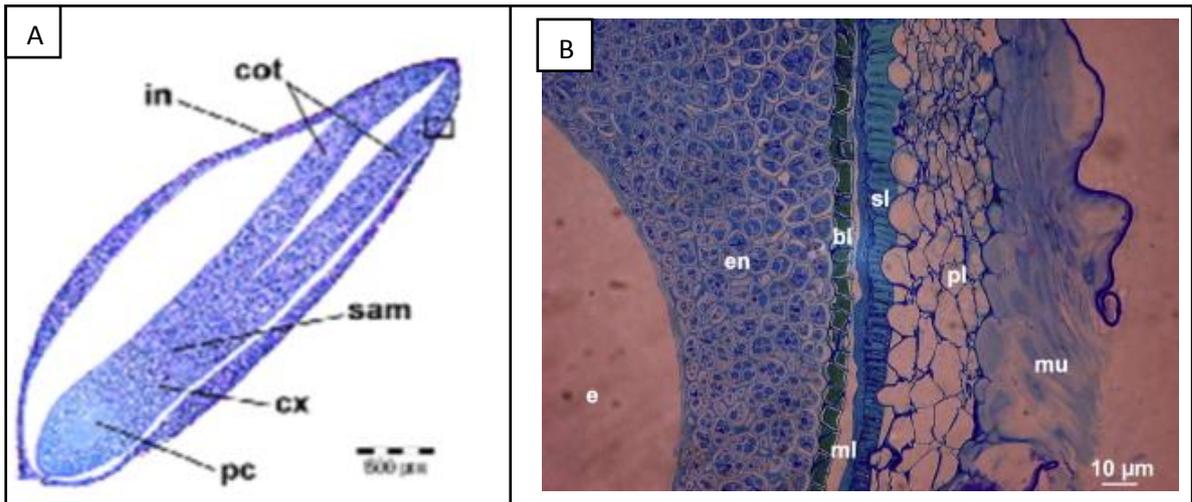
Du stade globulaire au stade torpille (**Figure 5 G, H**), l'embryon augmente de taille et mécanisme lié à la croissance exclusive des cotylédons. La pointe de l'embryon est apparente à la fin du stade torpille (**Figure 5 H**). Parallèlement, le zygote accessoire se divise pour former un albumen cellularisé au stade embryon. L'albumen augmente en taille jusqu'au stade torpille où l'albumen présente un espace important (Gutierrez *et al.*, 2006 ; Venglat *et al.*, 2011).

#### 1.2.2.2. Maturation des graines de lin.

La seconde étape (17 JAF à 30 JAF) correspond à l'étape de maturation. Les cellules embryonnaires ne se divisent plus. Cette phase d'expansion cellulaire correspond à l'étape d'accumulation des réserves nutritives. L'augmentation du volume de l'embryon est due exclusivement à l'augmentation du volume des cotylédons. A 20 JAF, l'embryon remplit le sac embryonnaire prenant l'ensemble de l'espace de la graine de lin. L'albumen occupant la majorité de l'espace au stade torpille, dégénère pour laisser la place à l'élongation de l'embryon et pour donner un support nutritionnel au développement de l'embryon. A 20 JAF, l'albumen est réduit à de très petites couches cellulaires entourant cet embryon et collé aux parois internes des téguments. Entre 20 et 40 JAF, les cotylédons augmentent de taille et une pigmentation marron apparaît sur la périphérie du tégument externe jusqu'à recouvrir l'ensemble de la graine de lin à 50 JAF (Venglat *et al.*, 2011).

### 1.2.3. Structure de la graine de lin mature.

Les graines des différentes variétés de lin sont ovales de dimensions 2,5mm\*5mm\*1mm et ont un poids moyen de 3 à 13 mg. La couleur des graines peut varier du jaune au brun (Wanasundara et Shahidi, 1997). Les graines de lin se composent de deux compartiments principaux : l'**embryon** et des enveloppes protectrices maternelles appelées **téguments** (Gutierrez *et al.*, 2006 ; **Figure 6 A**).



**Figure 6 : Structure de la graine de lin (*L. usitatissimum*).**

A : Structure de la graine de lin d'après Gutierrez *et al.*, 2006

cot, Cotylédon ; cx, cortex ; in, tégument interne ; pc, procambium ; sam, méristème apical

B : Photographie microscopique d'une coupe histologique d'une graine de lin (*Linum usitatissimum*) après coloration bleu-méthylène azur d'après Attoumbré *et al.*, 2010.

Abréviations : e : embryon ; Le tégument interne composé de l'endosperme (en) et la couche de cellules brunes (bl). Le tégument externe est composé d'une couche de cellule membraniforme (ml), d'une couche de cellule sclérenchymateuse (sl), de couches de cellules parenchymateuses (pl) et d'une couche de mucilage (mu).

Ces enveloppes protégeant l'embryon contre les attaques pathogènes et les dommages mécaniques sont constituées de deux téguments : un tégument interne composé de l'albumen et d'une couche de cellules brunes et un tégument externe comprenant une couche de cellules, des couches cellulaires sclérifiées, de plusieurs couches parenchymateuses et d'une couche de cellule contenant le mucilage (Attoumbré *et al.*, 2010 ; **Figure 6 B**).

### 1.3. Composition de la graine de lin mature.

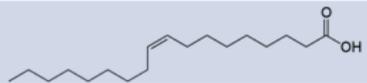
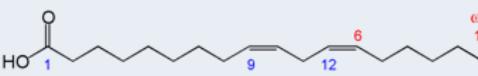
Les graines de lin sont composées majoritairement d'huile (30 à 45 %), de protéines (10 à 30 %) et de fibres alimentaires (25-32 %), mais également de composés secondaires

(Fernald, 1950 ; Gill, 1987 ; Daun *et al.*, 2003 ; Coskuner et Karababa 2007 ; Venglat *et al.*, 2011 ; Czemplik *et al.*, 2011). Les graines de lin présentent également des teneurs élevées en lignane et notamment en SDG (secoisolaricirésinol di-glucoside), 75 à 800 fois plus que dans les autres graines oléagineuses (Nesbitt *et al.*, 1999 ; Czemplik *et al.*, 2011). Les téguments sont composés majoritairement de polyphénols et de composés glucidiques (mucilage) alors que l'embryon est composé majoritairement d'huile et de protéines (Lepiniec *et al.*, 2006 ; Venglat *et al.*, 2011).

### 1.3.1. L'huile de lin.

Les graines de lin sont majoritairement composées d'huile (30 à 45 %) dont une partie se trouve dans les téguments (10 %) et au niveau des cotylédons (12 %). La majorité des huiles (78 %) est localisée au niveau des cellules de l'embryon, accumulée sous forme de triglycérides (TAGs). Les triglycérides sont constitués de trois acides gras estérifiés à un squelette de glycérol. Chez les graines de lin, les huiles sont composées majoritairement de 5 acides gras (**Tableau I**), l'acide palmitique (C16 :0) (4 à 6 %), l'acide stéarique (2 à 3 %), l'acide oléique (10 à 22 %), l'acide linoléique (12 à 18 %) et l'acide linoléique (50 à 62 %). La composition chimique de l'huile de lin peut varier selon les lieux de culture et les variétés (Froment *et al.*, 1999 ; Lafond *et al.*, 2008).

**Tableau I : Composition en acides gras de l'huile de lin (Gutiérrez *et al.*, 2010 ; Daun *et al.*, 2003).**

Nom de l'acide gras	Nomenclature biochimique	Formule semi-développée	Répartition (%)	% insaturés et saturés
Acide palmitique	C16:0		4-6	5-15 % d'Acides gras saturés
Acide stéarique	C18:0		2-6	
Acide oléique	C18:1 ω9		10-22	75-95 % d'Acides gras insaturés
Acide linoléique	C18:2 ω6		12-18	
Acide α-linolénique	C18:3 ω3		50-62	

L'huile de lin est riche en acides gras insaturés (90 % de l'huile totale) qui lui confèrent des propriétés siccatives intéressantes pour les industries chimiques et l'oléochimie (Jhala *et al.*, 2010 ; Dixit *et al.*, 2012). L'huile de lin est valorisée dans des industries non alimentaires intervenant dans la composition de vernis, peintures, encres d'impression, linoleum, agent durcissant (Jhala *et al.*, 2010).

L'huile de lin est également une huile qui présente un grand intérêt dans la consommation humaine par son profil en acides gras et notamment ses teneurs très élevées en  $\alpha$ -linoléique (50-62 %), en acide linoléique (12-18 %). L'acide  $\alpha$ -linoléique et l'acide linoléique sont deux acides gras essentiels non synthétisés par l'homme. Les désaturases et des élongases humaines peuvent convertir le C18:2 et le C18:3 en acide eicosapentaénoïque (EPA), acide docosahexaénoïque (DHA) et acide arachidonique longues chaînes (C20:5  $\omega$ 3; C22:6  $\omega$ 3; C20:4  $\omega$ 6) bénéfiques pour la santé humaine (Basch *et al.*, 2007 ; Lu *et al.*, 2010 ; Massaro *et al.*, 2010). En effet, la consommation de ces oméga-3 est nécessaire pour le développement normal du système nerveux et de l'acuité visuelle au niveau de la rétine (Uauy *et al.*, 1996). Un déficit de ces composés augmente les chances de diabète, cancer, arthrose, maladies inflammatoires, dépression, maladie du cœur, hypertension, problème de mémoire ou encore d'allergies (Morris, 2007). Des études ont également montré qu'une consommation d'huile de lin permettait une diminution de la pression artérielle, prévention de thrombose, diminution de 48 % de la quantité de protéines réactives C, d'une diminution de 32 % de sérum amyloïdes A (Allman-Farinelli *et al.*, 1999 ; Paschos *et al.*, 2005 ; Paschos *et al.*, 2007 ; Jhala et Hall, 2010).

Les problèmes actuels de santé humaine nécessitent un réajustement de notre consommation de lipides. Il est important de réduire le ratio oméga-6/oméga-3 dans l'alimentation humaine, qui est actuellement de 20:1. Les recommandations internationales au niveau nutritionnel sont de 4:1 à 10:1 (ANSES 2011). L'huile de lin présente un rapport oméga-6/oméga-3 de 0,3:1, bien différent de ceux observés dans les autres huiles végétales qui sont, en général, de 10:1 à 25:1. L'huile de lin est donc une huile de choix pour la consommation humaine permettant de rééquilibrer les rapports oméga-6/oméga-3 dans les régimes alimentaires en apportant un acide gras essentiel, l'acide linoléique (oméga-3) à l'organisme. L'huile de lin est alors utilisée en consommation humaine depuis l'arrêté

ministériel du 12/07/2010. Toutefois, le conditionnement de cette huile doit respecter un cahier des charges contraignant, imposant un conditionnement en récipient opaque de faibles capacités (250 mL), une durée de consommation qui doit être inférieure à 3 mois et un stockage sous azote, avec une complémentation en antioxydants, qui peut décourager les industriels (Arrêté du 12 juillet 2010).

### **1.3.2. Les protéines des graines de lin.**

Les graines de lin sont composées de protéines de stockage (10 à 30 %) qui sont accumulées dans les cotylédons (76 %) et une partie minoritaire au niveau de l'endosperme (16 %) (Oomah, 2003). Les protéines de stockage sont composées de 66 % de globulines (11S (légumine), 12S (cruciférine), et de 35 % d'albumine 2S (conline) (Oomah et Mazza, 1993 ; Venglat *et al.*, 2011). Très récemment, une globuline 7S a été détectée dans les graines de lin (Barvkar *et al.*, 2012). Ces protéines sont synthétisées au cours de la phase de maturation.

Ces protéines sont constituées d'acides aminés, dont les majoritaires sont l'acide glutamique (19,6 g/100g de protéines), l'acide aspartique (9,3 g/100g de protéines) et l'arginine (9,2 g/100g de protéines) (Chung *et al.*, 2005 ; Czemplik *et al.*, 2011). Les graines de lin contiennent des teneurs élevées en acides aminés essentiels comme la leucine (5,8 g/100g de protéines), la phénylalanine et la valine (4,6 g/100g de protéines), l'isoleucine et la lysine (4,0 g/100g de protéines) ou la thréonine (3,6 g/100g de protéines). Les teneurs en acides aminés sont similaires à celles trouvées dans les protéines de soja (**Tableaux II**). Ces proportions leur confèrent un très grand intérêt pour l'apport d'acides aminés essentiels dans l'alimentation humaine.

**Tableau II : Composition en acides aminés des graines de lin et de soja, d'après Morris, 2007.**

NR = Valeur non reportée

\*Acides aminés essentiels pour l'homme.

Acides aminés (g/100g protéines)	Lin		Soja
	Lin (graine marron)	Lin (graine jaune)	Soja
	(NorLin)	(Omega)	
<b>Alanine</b>	4,4	4,5	4,1
<b>Arginine</b>	9,2	9,4	7,3
<b>Acide Aspartique</b>	9,3	9,7	11,7
<b>Cystine</b>	1,1	1,1	1,1
<b>Acide Glutamique</b>	19,6	19,7	18,6
<b>Glycine</b>	5,8	5,8	4,0
<b>Histidine*</b>	2,2	2,3	2,5
<b>Isoleucine*</b>	4,0	4,0	4,7
<b>Leucine*</b>	5,8	5,9	7,7
<b>Lysine*</b>	4,0	3,9	5,8
<b>Méthionine*</b>	1,5	1,4	1,2
<b>Phénylalanine*</b>	4,6	4,7	5,1
<b>Proline</b>	3,5	3,5	5,2
<b>Sérine</b>	4,5	4,6	4,9
<b>Thréonine*</b>	3,6	3,7	3,6
<b>Tryptophane*<sup>c</sup></b>	1,8	NR	NR
<b>Tyrosine</b>	2,3	2,3	3,4
<b>Valine*</b>	4,6	4,7	5,2

### 1.3.3. Les composés glucidiques.

Deux types de sucres entrent dans la composition des graines de lin : l'amidon et les fibres alimentaires. La teneur en amidon est très faible (<1 %), alors que les teneurs en fibres alimentaires sont plus importantes (25-32 %) dans les graines de lin.

L'amidon, constituant de réserve des graines, est composé d'amylose (polymère linéaire de glucose lié par des liaisons  $\alpha$ 1-4) et d'amylopectine (polymère linéaire de glucose lié en  $\alpha$ 1-4, présentant des ramifications de glucose lié en  $\alpha$ 1-6). Ce composé est localisé dans les embryons et les téguments des graines de lin (Acket *et al.*, 2011).

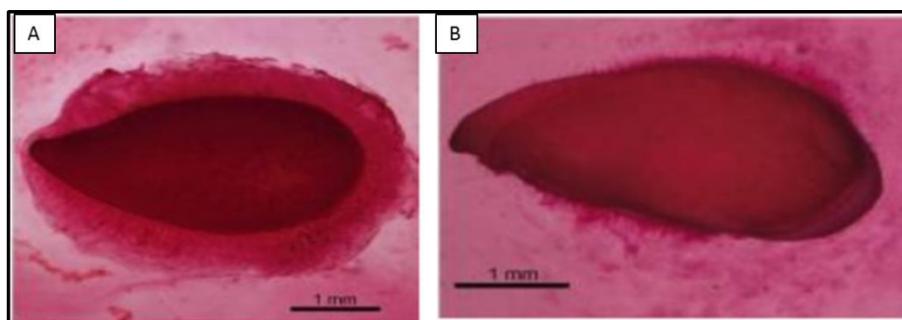
Les fibres alimentaires sont composées de polysaccharides complexes qui ne sont pas digérés et absorbés par l'intestin de l'Homme. Dans les graines de lin, les fibres alimentaires

sont constituées majoritairement de mucilage (6 à 8 % du poids de la graine), mais également de composés pariétaux tels que la cellulose et la lignine. Leur consommation permet de réduire l'appétit, de diminuer le temps de transit intestinal et de réduire la quantité de lipides dans le sang et ainsi réduire les risques de diabètes, de cancer colorectal, d'obésité et d'inflammation (Morris, 2007 ; Basch *et al.*, 2007 ; Jahla et Hall, 2010).

Le mucilage, localisé dans les téguments de la graine est composé d'une fraction constituée de polysaccharides neutres (75 % des sucres totaux) et d'une fraction (25 % des sucres totaux) constituée de polysaccharides acides (Warrand *et al.*, 2003 ; Guilloux *et al.*, 2009 ; Acket *et al.*, 2011 ; Czemplit *et al.*, 2011).

➤ La fraction de sucres neutres est constituée essentiellement de xylose (62,8 %), d'arabinose (16,2 %), de glucose (13,6 %) et de galactose (7,4 %). La quantité importante de xylose et d'arabinose indiquerait que la fraction neutre serait composée d'arabinoxylanes (Guilloux *et al.*, 2009), présentant des ramifications de glucose et de galactose.

➤ La fraction de sucres acides est constituée majoritairement de L-rhamnose (54,5 %), d'acide  $\alpha$ -galacturonique (23,4 %), de L-fucose (10 %) et dans une moindre mesure de galactose, de xylose (6 %), d'arabinose (2 %) et de glucose (4,5 %) (Warrand *et al.*, 2003). Ces proportions de sucres suggèrent qu'il s'agirait de rhamnogalacturonanes de type I, ayant des ramifications de D-galactose, L-galactose et de L-fucose.



**Figure 7 : Mucilage des graines de lin détecté par coloration au rouge de ruthénium (colorant les pectines) d'après (Naran *et al.*, 2008).**

A : Graines de lin placées directement en présence de rouge de ruthénium

B : Graines de lin incubées sous agitation durant une nuit avec du rouge de ruthénium

Quand les graines sont mises à germer, elles absorbent l'eau, le mucilage emprisonné dans l'espace apoplastique, se dilate engendrant la rupture de la paroi primaire permettant ainsi sa libération. Ce dernier forme un anneau de gélatine encapsulant les graines (Windsor *et al.*, 2000 ; Arsovski *et al.*, 2010) et pouvant être coloré par le rouge de ruthénium, colorant spécifique des pectines (**Figure 7**).

#### **1.3.4. Les composés phénoliques.**

Les graines de lin sont également composées de polyphénols, des métabolites secondaires présentant des propriétés bactéricides, antivirales, anti-tumorales, anti-oxydantes, intéressantes pour les industries pharmaceutiques et cosmétologiques. Ces molécules participent à la coloration des graines, et jouent aussi un rôle dans la protection de la plante contre les UV et de défense contre les pathogènes et les insectes ravageurs. Les composés phénoliques sont composés d'un noyau benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxylés, qui peuvent être méthylés, acylés ou glycosylés. Les polyphénols de ces graines de lin sont composés de faibles teneurs en acides phénoliques (8 à 10 g par kg de lin), en flavonoïdes et tanins (0,35-0,70 mg/g de graines) et d'une teneur élevée en lignane et notamment en SDG (secoisolaricirésinol di-glucoside) (26 mg/g de graines) et teneur 75 à 800 fois plus élevée que dans les autres graines oléagineuses (Nesbitt *et al.*, 1999 ; Czemplik *et al.*, 2011).

##### **1.3.4.1. Les acides phénoliques dans les graines de lin.**

Les acides phénoliques sont constitués de deux familles, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques.

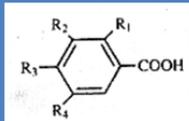
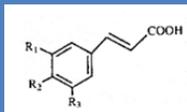
Les hydroxybenzoïques dérivant de l'acide benzoïque (acide gallique, acide syringique ; acide vanillique ; acide protocatéchine ; acide p-hydroxybenzoïque...) sont constitués d'un squelette à 7 carbones (C6-C1) alors que les acides hydroxycinnamiques (acide p-coumarique ; acide caféique ; acide férulique ; acide sinapique ; acide cinnamique) dérivant de l'acide cinnamique présentent un squelette carboné de type C6-C3 (**Tableau III**).

Dans les graines de lin, les acides phénoliques sont présents en faible quantité (8 à 10 mg par g de graine de lin) et sont constitués de 72 % d'acides hydroxycinnamiques (acide férulique : 48,8 %, acide sinapique : 17,2 %, acide-p-coumarique : 3,9 %, acide cinnamique :

1,9 %) et de 28 % d'acides hydroxybenzoïques (acide gallique : 9,1 %, acide syringique : 9,2 %, protocatéchique : 4,5 %, hydroxybenzoïque : 4,0 %, acide vanillique : 1,3 % ; Alu'datt *et al.*, 2013). Les acides hydroxycinnamiques sont des précurseurs nécessaires à la synthèse des lignanes, de la lignine, des flavonoïdes et des phytoalexines (Strack et Mock, 1993).

**Tableau III : Structure des principaux acides phénoliques.**

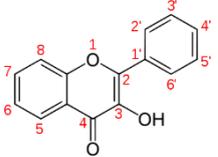
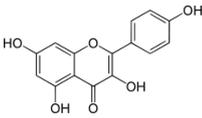
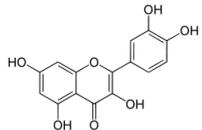
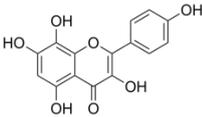
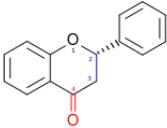
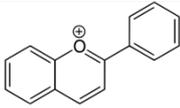
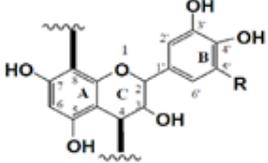
Abréviations : H : Hydrogène ; O : Oxygène ; OH : radical Hydroxy ; OCH<sub>3</sub> : groupement Méthoxy

Acides Hydroxybenzoïques		Acides hydroxycinnamiques	
			
Composés	Structure	Composés	Structure
Acide p-hydroxybenzoïque	R1=R2=R4=H, R3=O	Acide p-coumarique	R1=R3=H, R2=O
Acide protocatéchique	R1=R4=H, R2=R3=OH	Acide caféique	R1=R2=OH, R3=H
Acide vanillique	R1=R4=H, R2=OCH <sub>3</sub> , R3=OH	Acide férulique	R1= OCH <sub>3</sub> , R2=OH, R3= H
Acide syringique	R1=H, R2=R4=OCH <sub>3</sub> , R3=O	Acide sinapique	R1=R3=OCH <sub>3</sub> , R2=OH
Acide gallique	R1=H, R2=R3=R4=O	Acide cinnamique	R1=R2=R3=H

#### 1.3.4.2. Les flavonoïdes dans les graines de lin.

Les flavonoïdes sont des pigments responsables de la coloration des graines. Ces molécules servent à attirer les insectes pollinisateurs. Ils jouent aussi un rôle dans la protection de la plante contre les UV et de défense contre les pathogènes et les insectes ravageurs. Ils sont formés d'un squelette de base de 15 carbones organisé en structure C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Ce squelette est composé de deux noyaux aromatiques liés par 3 liaisons carbone-carbone. Le degré d'oxydation et les positions des substituants de leur hétérocycle centrale permettent de répartir les flavonoïdes en plusieurs classes, les flavones, les flavonols, les flavanones, les anthocyanines, les flavanols (**Tableau IV**). Les graines de lin sont constituées de 35 à 71 mg de flavonoïdes/100g de graines et majoritairement de flavonols (Oomah *et al.*, 1996).

**Tableau IV : Teneurs des différents flavonoïdes dans les graines de lin d'après Zuk *et al.*, 2011 ; Zuk *et al.*, 2012 ; Fliniaux *et al.*, 2014.**

Classe	Molécules	Teneur en mg/100g de graine* ou de tourteaux**	Références
<b>Flavonols</b> 	<b>Kaempférol</b> 	0,5*	Zuk <i>et al.</i> , 2011
	<b>Quercétine</b> 	0,4*	Zuk <i>et al.</i> , 2011
	<b>Herbacétine</b> 	576**	Fliniaux <i>et al.</i> , 2014
<b>Flavanones</b>		0,8*	Zuk <i>et al.</i> , 2011
<b>Anthocyanines</b>		0,4*	Zuk <i>et al.</i> , 2011
<b>Proanthocyanidines</b> <b>(polymère de flavanols)</b> <b>(tannins condensés)</b>		3,00	Zuk <i>et al.</i> , 2012

Les flavonols possèdent dans leur structure une fonction hydroxyle au niveau du carbone 3 et une fonction carbonyle au niveau du carbone 4 de l'hétérocycle centrale de base des flavonoïdes. Dans les graines de lin, ces flavonols sont composés de kaempférol (0,5 mg/100 g de graines), de quercétine (0,4 mg/100g de graines de lin) et d'herbacétine (576 mg/100g de MS de tourteau). Ces composés se retrouvent sous la forme glycosylée comme l'herbacétine 3, 8-O-diglucopynanoside, l'herbacétine 3, 7-O-diméthyl éther et le

kaempférol 3, 7-O diglucopyranoside (Qui *et al.*, 1999 ; Zuk *et al.*, 2011 ; Kasote, 2013 ; Fliniaux *et al.*, 2014).

L'herbacétine diglucoside (HDG) est un constituant des lignanes lié à des ponts esters à l'acide hydroxyméthylglutarique (HMG) (Struijs *et al.*, 2007). Les graines de lin accumulent également des anthocyanidines (0,4 mg/100g de graines), des flavanones (0,8 mg/100g de graines) et des proanthocyanidines (0,4 mg/100g de graines) (Zuk *et al.*, 2011 ; Zuk *et al.*, 2012). Les proanthocyanidines sont composés de flavanols (catéchine et épicatechine) qui sont reliées entre elles par une liaison carbone-carbone de type C4-C8 ou C4-C6. L'oxydation des proanthocyanidines durant la phase de dessiccation engendre une couleur brune des téguments dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* et de *Brassica napus* (Lepiniec *et al.*, 2006).

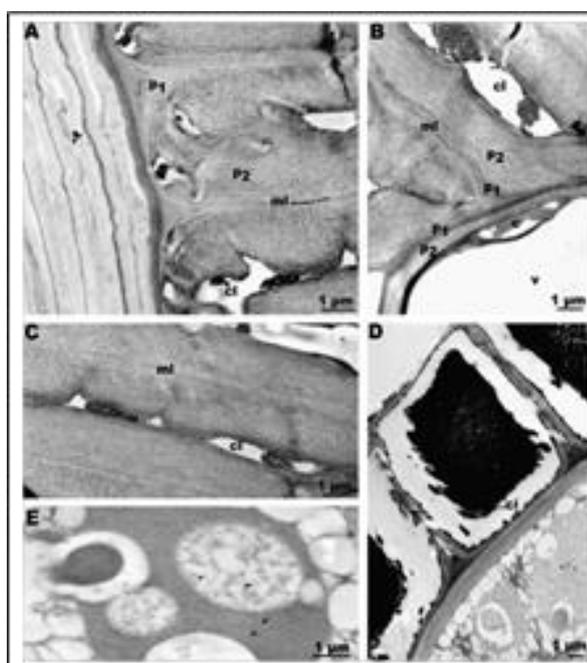
#### 1.3.4.3. Les lignanes dans les graines de lin.

Dès 1936, les lignanes sont définis comme étant un groupe de polyphénols correspondant à un dimère de phénylpropanoïdes dont les unités phénylpropanes sont liées au niveau de leur carbone 8 par une liaison ( $\beta$ - $\beta$ ) (Moss, 2000). Dans les graines de lin, le sécoisolaricirésinol sous sa forme conjuguée diglucosylée (SDG) est majoritairement produit à des teneurs très élevées variant entre 6,1 et 28,8 mg/g de graine et une production dépendant de nombreux facteurs comme les conditions de cultures et les variétés cultivées (Lamblin *et al.*, 2008 ; Cardoso carraro *et al.*, 2012). Les graines de lin sont également composées de matairesinol à des teneurs plus faibles (0,529 mg/100 g de matière fraîche) que les teneurs du SDG. Le matairesinol est un lignane synthétisé à partir du sécoisolaricirésinol par la sécoisolaricirésinol déshydrogénase (SD) (Lamblin *et al.*, 2008).

Le SDG est principalement localisé dans les téguments des graines (66%) et est également présent dans l'embryon de la graine à une concentration de 130 mg/100g de graines (Popova *et al.*, 2009). Une analyse de l'immunolocalisation de lignanes par immunomarquage (**Figure 8**) a montré que les lignanes étaient présents dans les couches de cellules sclérifiées (tégument externe) au niveau des parois cellulaires, mais également au niveau des inclusions cytoplasmiques de l'albumen (Attoumbré *et al.*, 2010).

De nombreux travaux de recherches ont montré que le SDG possède des propriétés bactéricides, antivirales, anti-tumorales, anti-oxydantes, de type phytoestrogènes

intéressant les industries pharmaceutiques et cosmétologiques (Lainé *et al.*, 2007 ; Basch *et al.*, 2007 ; Lamblin *et al.*, 2008 ). Tout particulièrement, le SDG est capable de piéger les formes radicalaires de l'oxygène révélant des activités intéressantes contre les cancers (Kitts *et al.*, 1999 ; Prasad, 2000 ; Basch *et al.*, 2007 ; Zuk *et al.*, 2012). Le SDG est capable de protéger spécifiquement les cellules épithéliales et les cellules du colon exposées à ces composés, des dommages de l'ADN et des liposomes (Rajasha *et al.*, 2006 ; Hu *et al.*, 2007). La consommation de graines de lin et notamment de ces composés pourrait participer à une alimentation fonctionnelle en prévention de certains cancers et notamment les cancers hormono-dépendants (Jahla *et al.*, 2010).



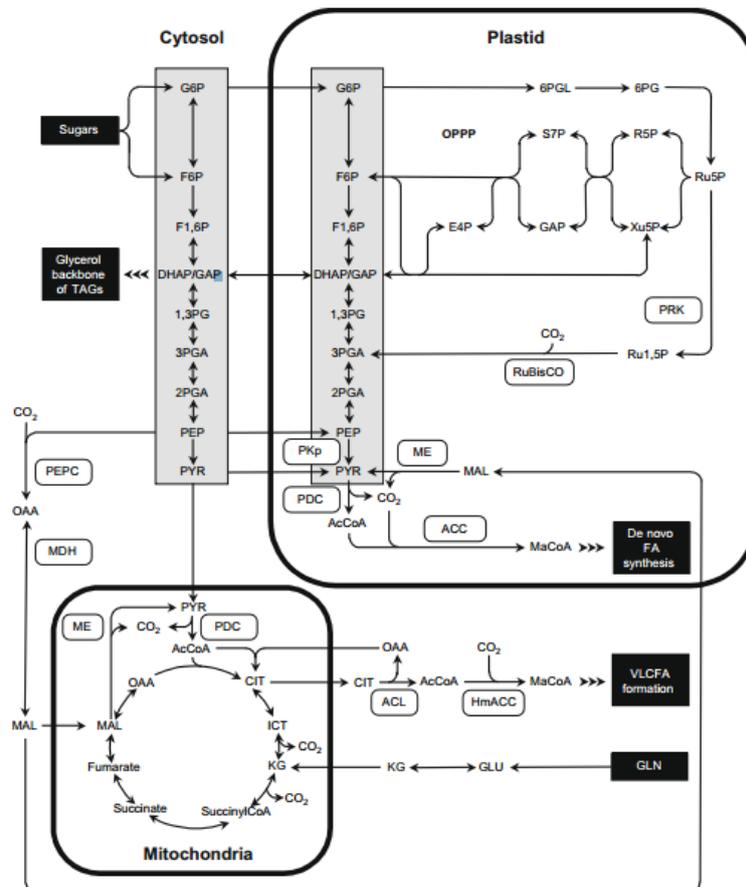
**Figure 8 : Immunolocalisation subcellulaire des lignanes dans différentes sections transversales de graines de lin : Observations faites en microscopie électronique à transmission, d'après Attoumbré *et al.*, 2010.**

A , B, C : Immunomarquage de lignanes dans la couche de cellules sclérenchymateuses (téguments externes) ; D : Immunomarquage de lignanes dans la couche brune du tégument interne ; E : Immunomarquage de lignanes dans les inclusions cytosoliques de l'albumen. Abréviations: c, cytoplasme; cl, lumière cytoplasmiques; ml, lamelle moyenne.

Les graines de lin représentent le compartiment majoritaire d'accumulation et de stockages des réserves. La quantité et la nature de ces composés accumulés (lipides, glucides, protéines, polyphénols) leurs donnent une importance considérable sur le plan économique. La compréhension de l'ensemble des réactions et des mécanismes de synthèses et des interconnexions des voies de biosynthèse de ces composés est importante pour comprendre pourquoi les graines de lin accumulent majoritairement de l'huile et notamment des oméga-3 dans leurs graines.

**CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE DES COMPOSÉS DE RÉSERVES.**

Les graines de lin sont composées d'huile, de protéines, de composés glucidiques et de polyphénols synthétisés durant la phase de maturation des graines. La synthèse de ces composés nécessite des substrats carbonés importés des organes sources (feuilles). Les molécules carbonées importées vont intervenir dans le métabolisme carboné des graines de lin : la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, le cycle de Krebs, et produire les précurseurs nécessaires à la synthèse des acides gras, des acides aminés, des composés glucidiques et des polyphénols (**Figure 9**).



**Figure 9 : Schéma simplifié du métabolisme central dans les graines oléagineuses durant la phase de maturation d'après Baud et Lepiniec, 2010.**

Les flèches représentent les flux de carbones. Les voies de la glycolyse sont en gris. ACC : acétyl-CoA carboxylase ; AcCoA : acétyl-coenzyme A ; ACL : ATP-citrate lyase ; CIT : citrate ; DHAP : dihydroxyacétone-3-phosphate ; E4P : érythrose-4-phosphate ; FA : fatty acid ; F1,6P : fructose-1,6-bisphosphate ; F6P : fructose-6-phosphate ; GAP : glycéraldéhyde-3-phosphate ; G6P : glucose-6-phosphate ; HmACC : homomeric acétyl-CoA carboxylase ; ICT : isocitrate ; KG : alpha-kétoglutarate ; MaCoA : malonyl-coenzyme A ; MAL : malate ; MDH : NAD-dependent malate dehydrogenase ; ME : enzyme malique, à noter que l'isoforme mitochondrial est dépendant du NAD alors que l'isoforme plastidial est dépendant du NADPH ; OAA : oxaloacétate ; OPPP : oxidative pentose phosphate pathway ; PDC : pyruvate dehydrogenase complex ; PEP : phosphoenolpyruvate ; PEPC : phosphoenolpyruvate carboxylase ; 6PG : 6-phosphogluconolactone ; 6PGL : 6-phosphogluconolactone ; 1,3PG : 1,3- bisphosphoglycérate ; 2PGA, 2-phosphoglycérate ; 3PGA : 3-phosphoglycérate ; Pkp : plastidial pyruvate kinase ; PRK : phosphoribulokinase ; PYR : pyruvate ; R5P : ribose-5-phosphate ; Ru1,5P : ribulose-1,5-bisphosphate ; Ru5P : ribulose-5-phosphate ; RuBisCO : ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase ; S7P : sedoheptulose-7-phosphate ; VLCFA : very long-chain fatty acid ; Xu5P : xylulose-5-phosphate.

L'étude de la possibilité d'augmenter la teneur en huile dans les graines nécessite la connaissance à la fois des flux de carbone contribuant à la disponibilité en substrats pour la synthèse des acides gras et de ceux provoquant les pertes de carbone dans les dernières étapes d'accumulation (Bates *et al.*, 2013). Les méthodes permettant d'obtenir de telles informations sur les réseaux métaboliques font appel aux techniques de manipulations génétiques, aux analyses transcriptomiques, aux analyses protéomiques et à l'analyse des flux métaboliques. Les modèles métaboliques ont prouvé leur capacité à identifier les cibles enzymatiques qui limitent le flux de carbone pour la synthèse des huiles alors que les manipulations génétiques ciblées permettent de confirmer le rôle et l'importance de ces protéines/enzymes dans les réseaux métaboliques.

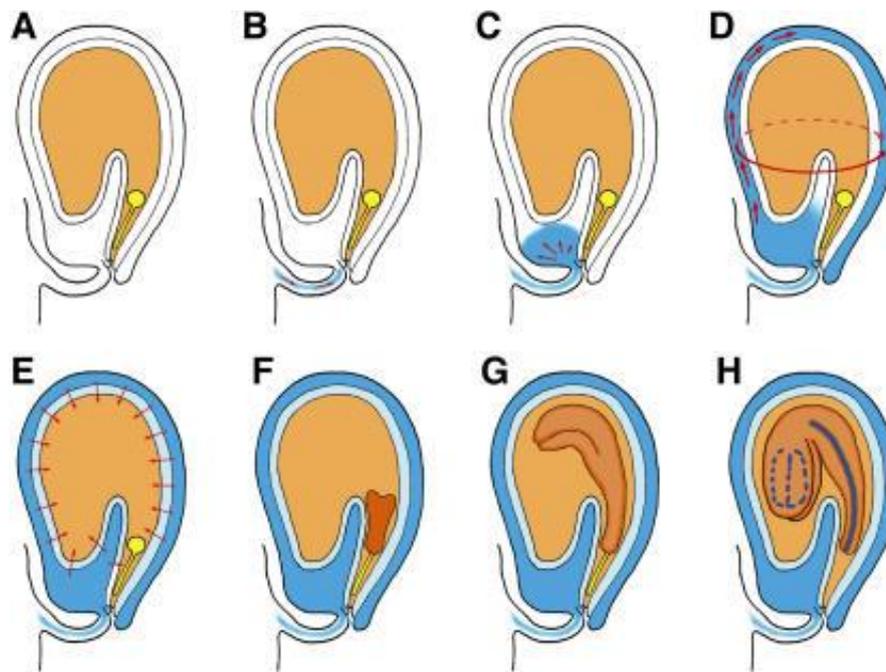
## **2.1. Origine des carbones et de l'azote pour la synthèse des acides gras dans les graines de lin.**

### **2.1.1. Importation des substrats carbonés et azotés.**

Dans les graines de colza et d'*Arabidopsis thaliana*, le saccharose, le glucose, le fructose et la glutamine sont fournis aux téguments puis à l'embryon (Baud *et al.*, 2002 ; Fait *et al.*, 2006) pour la synthèse des composés de réserves, et notamment des acides gras. Ces composés sont issus des produits de la photosynthèse des organes chlorophylliens (organes sources) durant la phase végétative des plantes. Ils sont chargés dans les tissus du phloème qui permettent le transport des photoassimilats des organes sources (feuilles), aux organes puits tels que la graine.

Un modèle a été établi pour structurer les voies de transfert des photoassimilats dans les graines chez *Arabidopsis thaliana* par une approche non destructrice en utilisant des constructions moléculaires ayant intégré la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle de différents promoteurs (**Figure 10**). Le transfert des photoassimilats débute par un flux d'assimilats dans le faisceau vasculaire du funicule pour se terminer dans le tégument à proximité du micropyle (**Figure 10 A, B**). Les photoassimilats se déchargent dans le domaine post-phloémien (**Figure 10 C**). Ce flux de photoassimilats parcourt la couche externe du tégument qui s'étend jusque la zone symplasmique (**Figure 10 D**). Un transport centripète depuis les couches internes du tégument vers l'albumen s'effectue en franchissant deux barrières apoplastiques (**Figure 10 E**). Pendant le stade cœur, la continuité symplastique entre l'embryon et le suspenseur est interrompue (**Figure 10 F**). Lors de la transition du

stade cordiforme à torpille, les connexions symplastiques entre l'épiderme et la couche interne du tégument diminuent alors que celles avec les cellules de l'épiderme sont nombreuses (**Figure 10 G**). Dans les embryons matures, la stèle de la racine et de l'hypocotyle commence à former un domaine indépendant (**Figure 10 H**). Le transfert entre le tégument externe et interne, entre le tégument interne et l'albumen, puis de l'albumen à l'embryon sont apoplastiques (Kim et Zambryski, 2005) et nécessite donc des transporteurs.



**Figure 10 : Modèle montrant les domaines symplastiques dans la graine d'*Arabidopsis thaliana* et les voies nutritionnelles dans la graine au cours du développement de l'embryon d'après Stadler *et al.*, 2005.**

A : Graine jeune d'*Arabidopsis thaliana*. Les tissus maternels sont en blanc, l'albumen en orange, le suspenseur et l'embryon sont en jaune.  
 B : Flux des assimilats dans le faisceau vasculaire. C : Déchargement des assimilats dans le domaine « post-phloémien ». D : Mouvements dans la couche externe du tégument qui s'étendent dans la zone symplasmique. E : Transport centripète depuis les couches internes du tégument vers l'albumen en franchissant les barrières apoplastiques. F : La continuité symplasmique entre l'embryon et le suspenseur est interrompue au stade cordiforme. G : Les connexions symplastiques entre l'épiderme et la couche interne du tégument diminuent graduellement, mais celles entre les cellules de l'épiderme sont nombreuses, lors de la transition du stade cordiforme au stade torpille. H : Embryons matures : La stèle de la racine et de l'hypocotyle commence à former un domaine indépendant.

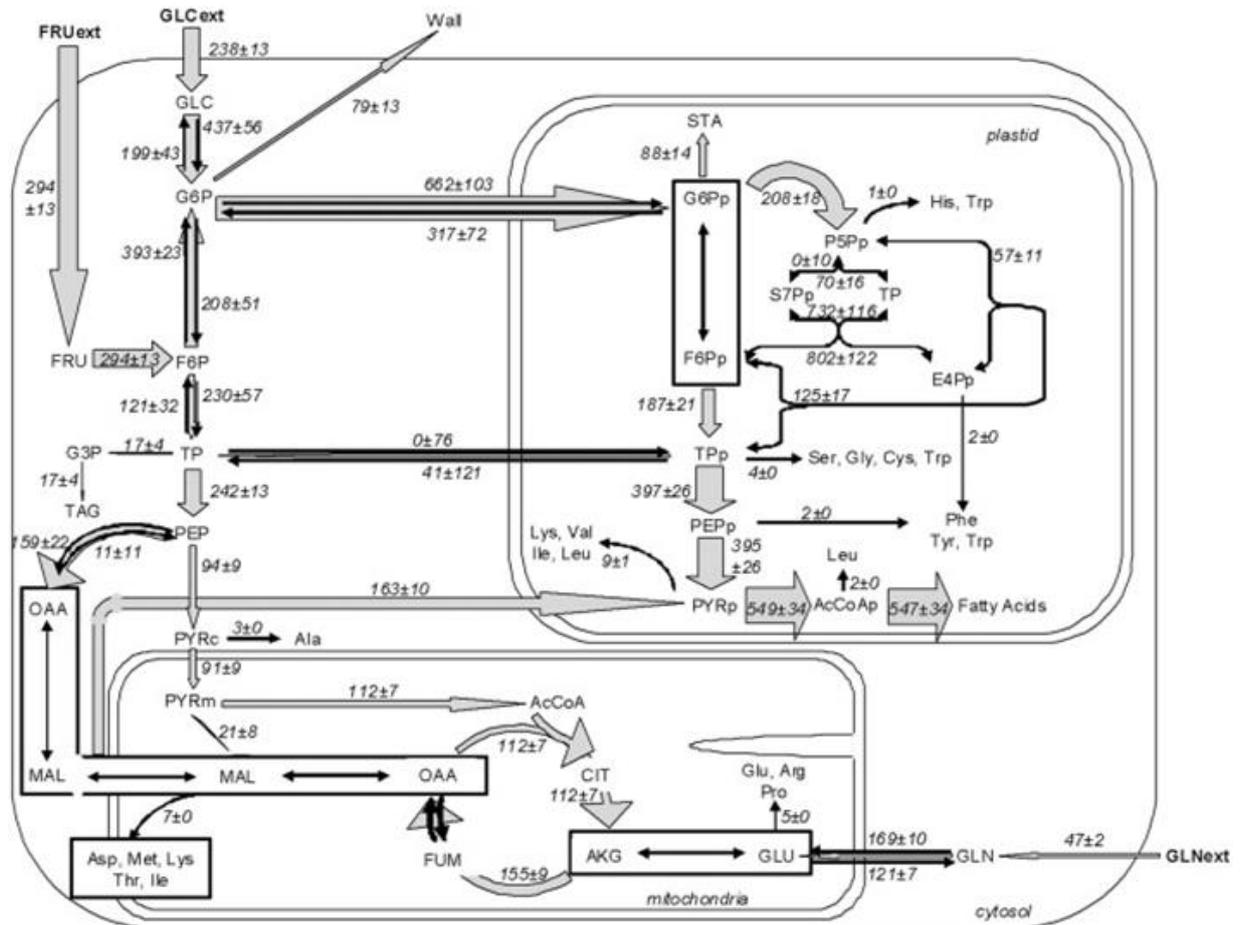
Dans les graines d'*Arabidopsis thaliana*, trois transporteurs de sucres (AtSUC2, AtSUC3, AtSUC5) sont présents. Le saccharose, le glucose et le fructose importés sont métabolisés par les réactions de la glycolyse pour produire les précurseurs nécessaires à la synthèse des lipides, alors que la glutamine est prise en charge par le cycle GS-GOGAT (Kim et Zambryski, 2005).

**2.1.2. Assimilation du carbone dans les embryons et voies conduisant à la synthèse des acides gras.**

**2.1.2.1. Assimilation de la glutamine et voie conduisant à la synthèse des acides gras à partir de la glutamine.**

La glutamine importée des organes sources permet la formation de deux molécules de glutamate par le transfert, via la glutamate synthase (GOGAT), du groupe amide (-NH<sub>2</sub>) de la glutamine sur deux molécules d'α-cétoglutarate issues du cycle de Krebs. L'une des molécules de glutamate servira à former de la glutamine par fixation du NH<sub>4</sub><sup>+</sup> via la glutamine synthétase (GS). Le glutamate et la glutamine sont deux acides aminés clés permettant la synthèse d'autres acides aminés. Toutefois la glutamine peut également contribuer à la synthèse des acides gras. En effet, les travaux effectués par Alonso *et al.* (2010) ont montré que les unités acétyl-CoA d'acides gras ont été significativement enrichies après une incubation des embryons en présence de [U-13C<sub>5</sub>] glutamine. Les auteurs indiquent que l'enrichissement des unités d'acétyl-CoA est induit par la glutamine transformée en pyruvate (précurseur de la synthèse des acétyl-CoA) par les réactions catalysées par la glutamate déshydrogénase, la cétoglutarate déshydrogénase, la fumarate et l'enzyme malique (**Figure 11**).

Toutefois, les recherches ont montré que les acides aminés présents en tant que substrats, ont été utilisés, de manière très limitée, comme précurseurs de carbone pour la synthèse des acides gras. Les travaux menés sur les précurseurs permettant la synthèse des acides gras ont montré que la synthèse des acides gras *de novo* est principalement soutenue par le catabolisme des sucres importés des téguments et que trois voies conduisent à la synthèse des acides gras (Allen *et al.*, 2009 ; Alonso *et al.*, 2010 ; O'grady *et al.*, 2012).



**Figure 11 : Flux métabolique dans les embryons de maïs d'après Alonso *et al.*, 2010.**

Flux sont définis en  $\text{nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ . Abréviations : GLNext : glutamine externe ; GLN : glutamine ; FUM : fumarate ; OAA : oxaloacétate ; AcCoAc : acétyl-CoA cytosolique, GLU : glutamate, PYRm : pyruvate mitochondriale, PYRc : pyruvate cytosolique ; PRO : proline ; ALA : alanine ; ASP : asparagine ; THR : thréonine ; ILE : isoleucine ; LYS : lysine ; AcCoAp : acétyl-CoA plastidial ; ICIT : isocitrate ; LEU : leucine ; VAL : valine ; TYR : tyrosine ; AKG : cétoglutarate ; PHE : phénylalanine ; SER : sérine ; GLY : glycine ; HID : histidine ; GLC ext : glucose externe ; SUCC : succinate ; G6P : glucose-6-phosphate ; PEP : phosphoénolpyruvate cytosolique ; PEPp : phosphoénolpyruvate plastidial ; F6Pp : fructose-6-phosphate plastidial ; E4Pp : erythrose-4-phosphate plastidial ; S7Pp : sedoheptulose 7-phosphate ; TPp : phosphoglycérate plastidial ; TP : triose phosphate ; TPp : triose phosphate plastidial ; CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone ; CO<sub>2</sub>\_ext : dioxyde de carbone externe ; ARO : intermédiaires aromatiques ; G3P : glyceraldéhyde-3-phosphate ; Fruc : fructose ; Suc : saccharose ; WALL : composés pariétaux ; STA : amidon ; P5Pp : ribose-5-phosphate ; GLC : glucose. Les métabolites comportant le suffixe ext sont les métabolites d'entrée.

2.1.2.2. Assimilation des sucres et voie conduisant à la synthèse des acides gras à partir des sucres importés.

2.1.2.2.1. Assimilation des sucres et les réactions de la glycolyse.

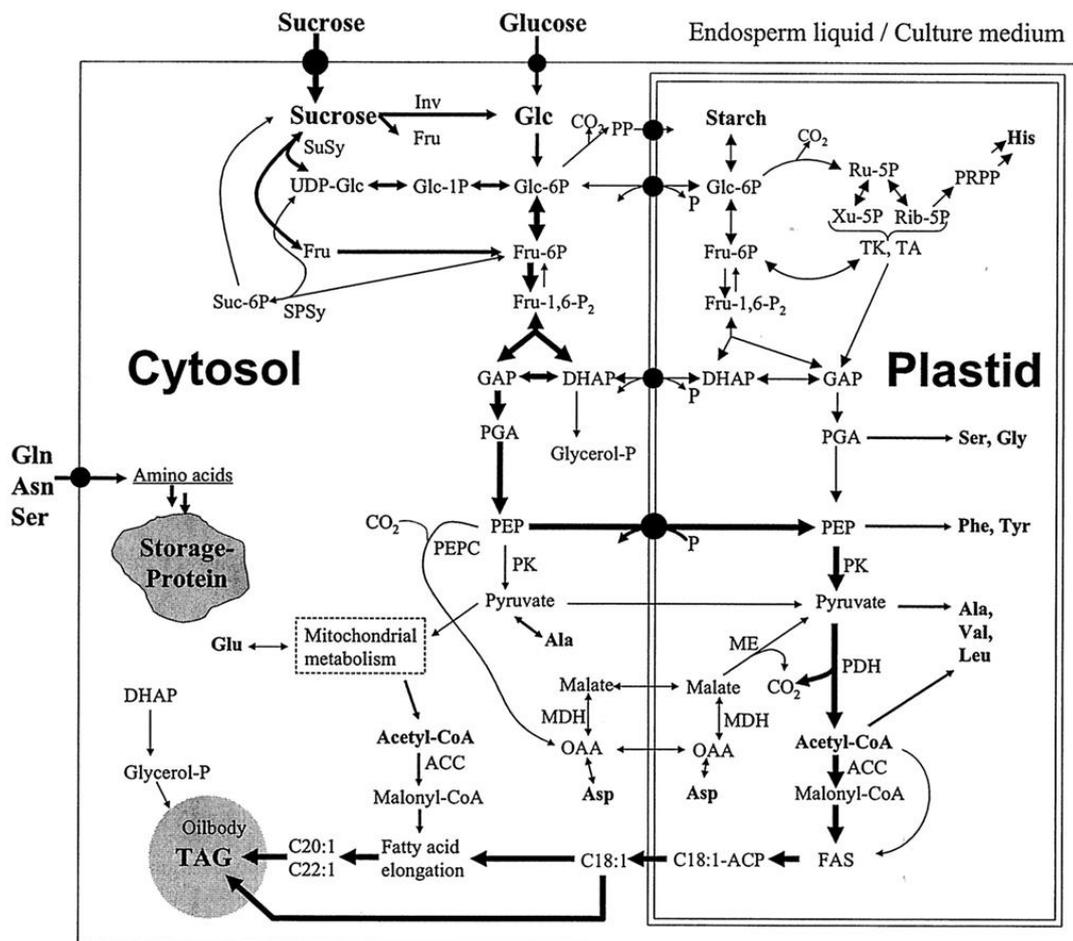
Le saccharose, importé des téguments est hydrolysé en glucose et fructose, par les invertases situées au niveau des parois cellulaires, du cytosol ou de la vacuole (Sturm, 1999) ou par la saccharose synthase (SuSY) pour former le fructose et l'UDP-glucose. Dans les embryons de lin, quatre isoformes ont été identifiés et sont exprimés au cours de la phase de l'embryogenèse. L'expression maximale des SuSY se situe à 12 JAF et devient très faible durant la phase d'accumulation des réserves à 16 JAF (Barvkar *et al.*, 2012). Les hexoses produits sont métabolisés par les réactions de la glycolyse. La voie de la glycolyse implique de nombreuses réactions catalysées par des enzymes qui dégradent les molécules de glucose, fructose et saccharose. Ces molécules sont converties en deux molécules de pyruvate qui seront converties par la pyruvate déshydrogénase en acétyl-CoA précurseurs de la synthèse des acides gras.

Les analyses protéomiques et transcriptomiques effectuées avec des embryons de colza, d'*Arabidopsis thaliana*, de colza, de ricin et de maïs ont également montré la présence de l'ensemble des enzymes dans le cytosol et les plastes et l'existence d'échanges entre le cytosol et le plaste entre ces molécules (Schwender *et al.*, 2003). L'analyse des flux métaboliques dans les embryons de ces plantes a montré qu'il existe trois voies conduisant à la synthèse des acides gras à partir des sucres importés (Schwender *et al.*, 2003).

2.1.2.2.2. Les voies conduisant à la synthèse des acides gras.

- Première voie menant à la synthèse des acides gras.

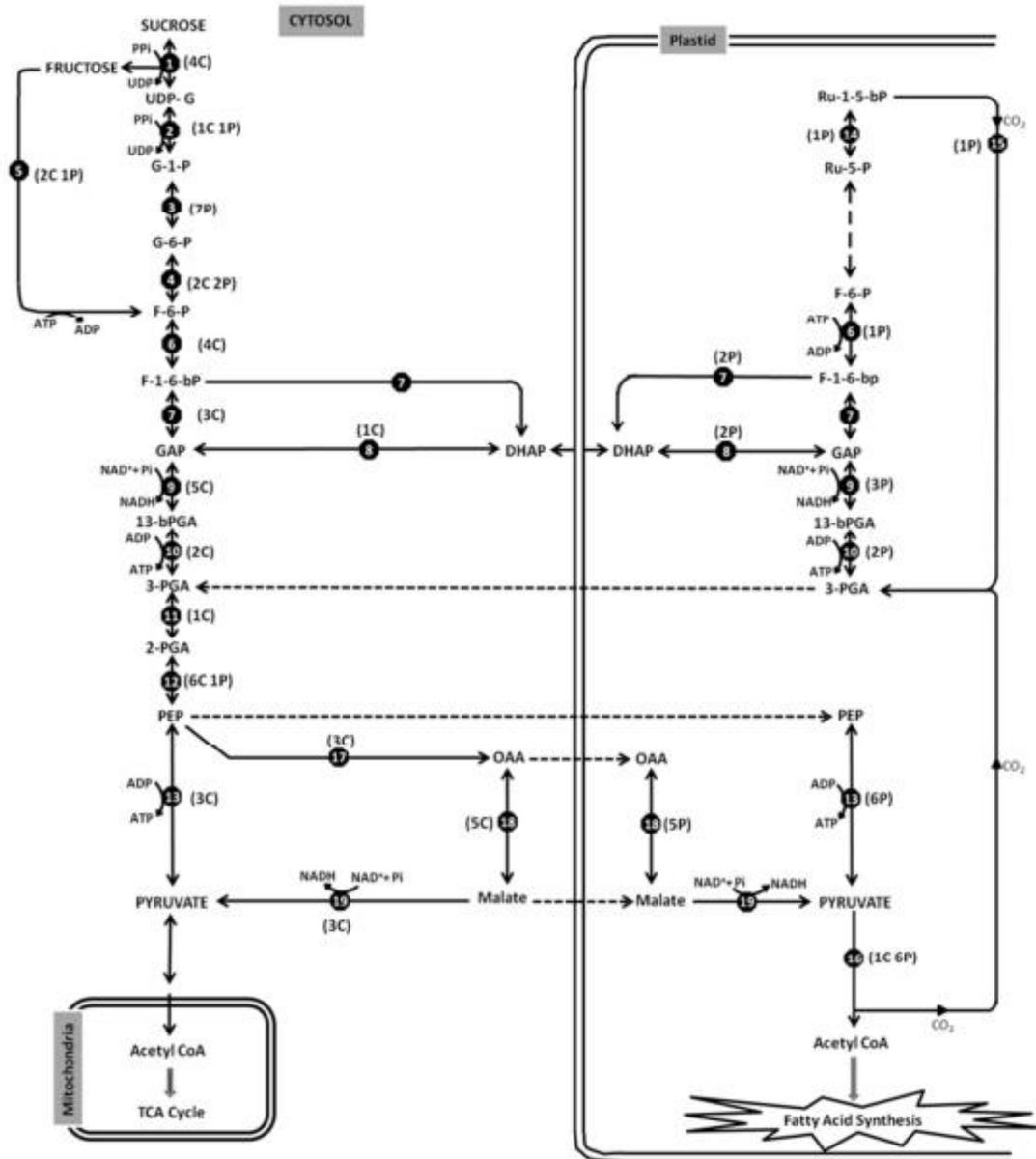
Les analyses des flux métaboliques dans les embryons d'*Arabidopsis thaliana* (Lonien et Schwender, 2009) et de colza (Schwender *et al.*, 2003) ont montré que le glucose et le saccharose importés de l'albumen permettent la synthèse des acides gras dans les embryons. Dans ce cas, le flux de carbone permettant la synthèse des acides gras dans les embryons passe majoritairement par la glycolyse cytosolique jusqu'au phosphoénolpyruvate (PEPcytosolique) et le pyruvate cytosolique. Le PEPc est alors transporté vers le plaste pour être converti en acétyl-CoA, précurseur de la synthèse des acides gras et le pyruvate est transporté vers le plaste par un transporteur de pyruvate (**Figure 12**).



**Figure 12 : Schéma du métabolisme du carbone central dans le développement des embryons de *B. napus* lors d'une accumulation d'huile d'après Schwender *et al.*, 2003.**

Abréviations : ACC : acétyl-CoA carboxylase ; FAS : « fatty acid synthase » ; Inv : invertase ; MDH : malate déshydrogénase ; ME : enzyme malique ; PEPC : PEP carboxylase ; PK : pyruvate kinase ; SPSy : saccharose phosphate synthase ; SuSy : saccharose synthase ; Fru-1,6-P2 : fructose-1,6-bisphosphate ; Glc-1P : glucose 1-phosphate ; OAA : oxaloacetate ; PGA : 3-phosphoglycérate ; PRPP : phosphoribosyl pyrophosphate ; PP : pentose phosphate ; TAG : triacylglycerol ; acide octadécénoïque (C18:1) ; acide eicosénoïque (C20:1) et acide docosénoïque (C22:1).

Une analyse protéomique (Barvkar *et al.*, 2012) effectuée sur les embryons de lin au cours de la phase de maturation des graines a montré que les isoformes de toutes les enzymes de la glycolyse ont été identifiées systématiquement dans le cytosol et dans les plastes exceptées la 2,3-bisphosphoglycérate-independent phosphoglycerate mutase (PGAM) localisée uniquement dans les plastes, la phosphoglucomutase (PGM) et l'énolase présentes spécifiquement dans le cytosol. Le transporteur de pyruvate entre les compartiments cytosolique et plastidial n'a pas été identifié chez le lin (**Figure 13**).



**Figure 13 : Métabolisme carboné durant le développement des graines de lin d'après Barvkar et al., 2012.**

Les valeurs entre parenthèses représentent le nombre d'isoforme identifiés pour la protéine. C et P désigne la localisation cytosolique ou plastidiale des enzymes. Abréviations : UDP-G : uridine diphosphoglucose ; G-1-P : glucose 1 phosphate ; G-6-P : glucose 6 phosphate ; F-6-P : fructose 6 phosphate ; F-1,6bP : fructose 1,6- bisphosphate ; GAP : glycéraldéhyde 3-phosphate ; DHAP : dihydroxyacétone phosphate ; 1,3-bis PGA : acide 1,3-bisphosphoglycérique ; 3-PGA : acide 3-phosphoglycérique ; 2-PGA : acide 2-phosphoglycérique ; PEP : phosphoénolpyruvate. Les enzymes sont : 1 : saccharose synthase ; 2 : UDP-glucose pyrophosphorylase ; 3 : phosphoglucomutase ; 4 : glucose-6-phosphate isomérase ; 5 : fructokinase ; 6 : phosphofructose kinase ; 7 : fructose-bisphosphate aldolase ; 8 : triose-phosphate isomérase ; 9 : glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase ; 10 : phosphoglycérate kinase ; 11 : 2,3-bisphosphoglycerate independent PGAM ; 12 : énoïase ; 13 : pyruvate kinase ; 14 : phosphoribulokinase ; 15 : ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase oxygénase (RuBisCO) ; 16 : pyruvate déshydrogénase ; 17 : PEP carboxylase ; 18 : malate déshydrogénase ; 19 : enzyme malique NADP dépendante.

La PGAM permet la conversion de l'acide 3-phosphoglycérique (3PGA) en acide 2-phosphoglycérique (2PGA) et l'énoïase permet la conversion de l'acide 2-phosphoglycérique

(2PGA) en PEP. Les auteurs émettent l'hypothèse que la présence exclusive de ces protéines dans le cytosol pourrait indiquer que le PEP serait produit dans le cytosol puis transporté vers les plastes pour être converti en pyruvate puis en acétyl-CoA pour la synthèse des acides gras (Barvkar *et al.*, 2012).

L'analyse protéomique effectuée sur les embryons de lin au cours du développement a également montré que la présence de certaines enzymes dans les plastes et le cytosol semblerait indiquer des échanges entre ces deux compartiments. En effet, il pourrait y avoir des échanges entre le pool de dihydroxyacétone phosphate (DHAP) plastidial et le le pool de dihydroxyacétone phosphate (DHAP) cytosolique. Le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) est synthétisé à partir du fructose 1,6 biphosphate et du glycéraldéhyde-3-phosphate par la fructose bisphosphate aldolase et la triose phosphate.

- Seconde voie menant à la synthèse des acides gras.

Les analyses des flux métaboliques dans les embryons de maïs (Alonso *et al.*, 2010) ont montré que le glucose, le fructose et la glutamine importés permettent la synthèse des acides gras dans les embryons. Dans ce cas, le flux de carbone permettant la synthèse des acides gras à partir du fructose et du glucose dans les embryons passe par la glycolyse cytosolique jusqu'au glucose-6-phosphate cytosolique (G6Pc) qui est alors transporté vers le plaste pour être converti, par les réactions de la glycolyse plastidiale, en acétyl-CoA, précurseur de la synthèse des acides gras (**Figure 11**).

L'analyse protéomique effectuée avec des embryons de lin au cours de leur développement n'a pas révélé de protéines permettant le transport du glucose-6-phosphate du cytosol au chloroplaste indiquant que cette voie semblait peu probable dans les embryons de lin.

- Troisième voie menant à la synthèse des acides gras.

Plaxton et Podesta 2006 ont émis l'hypothèse que le flux de carbone conduisant à la synthèse des acides gras dans les leucoplastes de ricin pourrait passer par la glycolyse cytosolique jusqu'au phosphoénolpyruvate (PEPcytosolique) qui est alors convertie en acide oxaloacétique par la PEPc. L'acide oxaloacétique est converti en malate par la malate déshydrogénase (MDH). Celui-ci est ensuite transporté vers le plaste pour être converti en

acétyl-CoA. Les études réalisées par Alonso *et al.* (2010) ont également montré qu'une partie minoritaire du glucose et du fructose importés pouvait permettre la synthèse des acides gras par cette voie chez le maïs. Or, l'analyse protéomique effectuée dans les embryons de lin a également montré la présence de phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC), de malate déshydrogénase (MDH) et d'enzyme malique décarboxylase dans le cytosol des embryons de lin (Barvkar *et al.*, 2012). Les auteurs émettent l'hypothèse que le flux de carbone permettant la synthèse des acides gras pourrait passer par cette troisième voie de synthèse (**Figure 13**).

### **2.1.3. Rôle de la ribulose 1,5 bisphosphate (RUBISCO) pour la synthèse des acides gras.**

La ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase est une enzyme du processus de la photosynthèse assurant la fixation du CO<sub>2</sub> sur une molécule de ribulose 1,5 bisphosphate en présence de lumière générant deux molécules de 3-phosphoglycérate (3PGA) dans le chloroplaste. Les embryons de colza, de soja et d'*Arabidopsis* sont verts au cours de la phase de maturation et présentent une activité photosynthétique. Les travaux effectués avec ces embryons ont montré que la photosynthèse assure avec efficacité la conversion du carbone pour la synthèse des huiles dans ces graines (Schwender *et al.*, 2004 ; Goffman *et al.*, 2005). En effet, les processus cataboliques et biosynthétiques génèrent du CO<sub>2</sub> qui peut être refixé, résultant en une perte nette de CO<sub>2</sub> réduite. Par des approches de marquages au carbone 13 dans les embryons de colza, il a été montré que 50 % du 3PGA est formé par la ribulose 1,5 bisphosphate démontrant que l'activité de cette enzyme contribue fortement à l'apport carboné (Schwender *et al.*, 2004, 2006). Les études théoriques basées sur des expériences de marquage au carbone 13 montrent que la quantification fiable du flux à travers la ribulose 1,5 bisphosphate n'est pas simple (Libourel *et al.*, 2007). Toutefois, les travaux effectués par Schwender *et al.* (2004) ont montré que le flux relatif par la ribulose 1,5 bisphosphate augmente avec l'intensité de la lumière.

Durant la phase d'accumulation des réserves, les embryons de lin ont une couleur verte et présentent des structures thylakoïdiennes dans les plastes disparaissant progressivement de 26 JAF à 46 JAF. La présence de thylakoïdes dans les embryons (Troufflard, 2004) et la détection d'une expression importante du gène codant pour la ribulose 1,5 bisphosphate

carboxylase/oxygénase (RUBISCO) dans les plastes des graines de lin en début de développement (Barvkar *et al.*, 2012), sembleraient témoigner d'une activité photosynthétique active à ce stade pouvant contribuer à la fourniture en substrat carboné des acides gras. L'analyse protéomique effectuée dans les embryons de lin a montré la présence de la ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase (RUBISCO) (Barvkar *et al.*, 2012). Dans ces travaux, l'expression du gène codant pour cette protéine est très importante dans les stades précoces de la phase de maturation. Les auteurs émettent l'hypothèse que la présence de la RUBISCO pourrait contribuer à la synthèse des acides gras.

## **2.2. Métabolisme lipidique chez les plantes oléagineuses.**

Les graines de lin oléagineux ont des teneurs élevées en huile (30 à 45 %). Ces lipides sont synthétisés entre 4 et 30 JAF (Jours Après Floraison) dans les embryons (Barvkar *et al.*, 2012).

### **2.2.1. Synthèse *de novo* des acides gras classiques chez les végétaux.**

Les lipides sont des composés primaires synthétisés par une voie métabolique (**Figure 14**) présente dans toutes les cellules vivantes (levures, animaux, végétaux) avec quelques spécificités particulières en fonction de l'organisme.

Chez les végétaux, la synthèse des acides gras est compartimentée (Ohlrogge et Browse, 1995 ; Bates *et al.*, 2013 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014). Les carbones du précurseur métabolique des acides gras (acétyl-CoA) proviennent du pyruvate et des hexoses. La synthèse des acides gras se fait à partir de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA dans les plastes (jusque 18 carbones). Pour produire ces acides gras à 16 ou à 18 carbones, 30 réactions enzymatiques sont nécessaires à partir de ces deux précurseurs métaboliques. La synthèse des acides gras se fait par intervention de plusieurs complexes multi protéiques, l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase) et la fatty acid synthase (FAS) (Baud et Lepiniec, 2010 ; Bates *et al.*, 2013 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014).



La première étape de cette synthèse des acides gras s'effectue par la synthèse de malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase) à partir de l'acétyl-CoA et du bicarbonate. Le groupe malonyl est alors transféré du CoA à une protéine (Acyl Carrier Protein) par la S-malonyltransférase (MAT) permettant de produire le malonyl-ACP. La chaîne carbonée se forme par la condensation successive de l'acétyl-CoA et du malonyl-ACP permettant la synthèse de molécules carbonées jusqu'à 18 carbones (Ohlrogge et Browse, 1995 ; Ohlrogge et Jaworski, 1997). La condensation successive de l'acétyl-CoA et du malonyl-ACP est assurée par un complexe multi-enzymatique la fatty acid synthase constituée des KASI, KAS II, KAS III. L'activité de ce complexe nécessite une acyl-carrier protéine comme co-substrat. Les acyl-ACP formés sont hydrolysés par des acyl-ACP thioestérase (FATA ou FATB) pour former les acides gras libres. Les acides gras libres sont ensuite estérifiés à du CoA par l'acétyl-CoA synthétase (ACS) au niveau de la membrane du chloroplaste. Les acyls CoA formés sont exportés dans le cytosol ou vers le réticulum endoplasmique pour une incorporation soit dans les triglycérides ou les phospholipides membranaires (Baud et Lepiniec, 2010 ; Bates *et al.*, 2013 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014).

#### 2.2.1.1. L'acétyl-CoA carboxylase (ACCase).

L'acétyl-CoA carboxylase est la première enzyme de la voie de biosynthèse des acides gras et figure comme une étape clé ayant une répercussion directe sur les teneurs en huiles dans les graines d'oléagineux. Cette enzyme se compose de 3 sous unités, la biotine carboxylase (BC), la biotine carboxyl carrier protéine (BCCP), la carboxyltransférase (CT). La CT est composée de deux sous unités, la sous unité  $\alpha$  de la carboxyltransférase ( $\alpha$ -CT) et la sous unité  $\beta$  de la carboxyltransférase ( $\beta$ -CT). Du fait de cette conformation enzymatique, la réaction permettant la carboxylation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, s'effectue en trois étapes. La BC permet la fixation de l'ion bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) sur un azote du cycle biotine de la BCCP. La biotine de la BCCP amène le bicarbonate du site BC au site CT ( $\alpha$  et  $\beta$ ). La CT ( $\alpha$  et  $\beta$ ) transfère l'ion bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) activé du cycle biotine sur un acétyl-CoA pour produire du malonyl-CoA.

Dans les graines de plantes oléagineuses, deux types d'acétyl-CoA carboxylase sont présentes, la forme cytosolique (type I) et la forme chloroplastique (Type II). L'acétyl-CoA

carboxylase de type I, correspond à un polypeptide de 250 kDa, qui est aussi impliqué dans la biosynthèse des flavonoïdes et des chaînes d'acyles. L'acétyl-CoA carboxylase de type II, comprend également les domaines BC, BCCP et CT ( $\alpha$  et  $\beta$ ) formant un complexe hétérodimère de 650-700kDa. Cet hétérodimère est localisé au niveau de la membrane des chloroplastes. Ce complexe est responsable de la synthèse *de novo* des chaînes d'acyles (Baud et Lepiniec, 2010 ; Bates *et al.*, 2013 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014).

Les études menées sur l'accumulation de lipides ont montré que l'activité de l'ACCCase de type II est très importante pour augmenter les teneurs en huile. Un des premiers paramètres intervenant dans la régulation de l'activité ACCCase de type 2 est la lumière. En effet, il a été observé que l'activité de l'ACCCase de type II diminue à l'obscurité chez l'épinard et le pois conduisant à une diminution de la teneur en malonyl-CoA et de celle en acides gras (Baud et Lepiniec, 2010). La synthèse de malonyl-CoA par l'ACCCase de type II nécessite également l'intervention de cofacteurs tels que l'ATP et le NADPH et les rapports de concentrations en ATP/ADP et NADP/NADPH pouvaient influencer l'activité enzymatique et les teneurs en acides gras. L'analyse des flux métaboliques dans les embryons photosynthétiques ont montré que l'activité du cycle de Krebs et celle des voies des pentoses phosphates sont plus faibles que dans les embryons non photosynthétiques témoignant d'un apport d'ATP et de NADPH pouvant provenir majoritairement des réactions de la photosynthèse (O'grady *et al.*, 2012). L'activité de cette enzyme est également stimulée par les teneurs en CoA, en acétyl-CoA et en acyls CoA, alors que la teneur en acides gras libres ou en acyls-ACP à longue chaîne entraîne une inhibition de l'ACCCase dans les suspensions de tabac (Baud et Lepiniec, 2010 ; Bates *et al.*, 2013 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014). La surexpression de l'ACCCase cytosolique d'*Arabidopsis thaliana* dans le plaste de colza (*Brassica napus*) a permis d'augmenter la teneur en huile de 5 % (Roesler *et al.*, 1997).

#### 2.2.1.2. La Fatty Acid Synthase (FAS)

La Fatty Acid synthase (FAS) est un complexe enzymatique qui permet la synthèse d'une chaîne carbonée d'acides gras de 16 à 18 carbones par l'incorporation de malonyl-ACP et d'acétyl-CoA. Ce complexe FAS est constitué de plusieurs enzymes, le cétoacyl-ACP synthase (KAS), le cétoacyl-ACP réductase (KAR), l'hydroxyacyl-ACP déshydratase (HAD), l'énoyl-ACP réductase (EAR) et la  $\Delta 9$ -stéaroyl ACP désaturase (Baud et Lepiniec 2010 ; Bates *et al.*, 2013 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014).

La 1<sup>er</sup> étape de l'élongation de la chaîne acyl-ACP s'effectue par les KAS. Les KAS comprennent trois isoformes (KAS I/KASB, KAS II/KASA, KAS III) qui présentent chacune une spécificité au niveau du substrat carboné. En effet, la première étape de l'élongation du malonyl-ACP avec de l'acétyl CoA pour produire du 4:0-ACP se fait exclusivement par la KAS III. Les condensations successives de la chaîne carbonée avec le malonyl-ACP à partir du 4:0-ACP jusque le 14:0-ACP s'effectue avec la KAS I/KASB. La KAS II/KASA permet l'élongation du 16:0-ACP jusque le 18:0-ACP (Bates *et al.*, 2013 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014). Les ESTs codant pour les 3-cétoacyl-acyl carrier protéines (KAS I, KAS II, KAS III) présentent une quantité de transcrits très importante durant les stades d'embryogenèse et notamment au stade torpille dans les embryons (Venglat *et al.*, 2011). L'expression de ces ESTs est faible durant la phase de maturation.

Dans les embryons, le nombre d'EST exprimé est plus important pour la KAS I, que pour les KAS II et III. L'expression des ESTs codant pour les protéines de type 3-cétoacyl-acyl carrier ont également montré une expression des ESTs codant pour les KAS I et II au niveau de l'albumen et des téguments des graines de lin notamment au stade torpille. Ces résultats montrent que les embryons, l'albumen et les téguments des graines de lin peuvent être des lieux de synthèse des huiles dans les graines. L'expression de ces gènes codant pour les KAS I et II est plus élevée au niveau de l'albumen et des téguments au stade torpille, semblant indiquer une synthèse de lipides dans les téguments des graines de lin (Venglat *et al.*, 2011).

L'élongation complémentaire de l'acide gras, après chaque étape de condensation, s'effectue par la KAR, la HAD et l'EAR. La KAR permet la réduction de l'acyl-ACP en hydroacyl-ACP entre chaque étape de condensation. Cette étape nécessite du NADPH. L'hydroacyl-ACP est alors déshydraté en énoyl-ACP par la HAD. La réduction de l'énoyl-ACP en acyl-ACP saturé est effectuée par l'EAR et par consommation du NADPH (Bates *et al.*, 2013 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014).

#### 2.2.1.3. L'acyl-ACP thioestérase (TE).

L'acyl-ACP thioestérase (TE) est une enzyme qui met fin à l'élongation de la chaîne carbonée par hydrolyse des acyl-ACP. L'hydrolyse des ACP permet de libérer des acides gras libres qui seront ensuite estérifiés dans le chloroplaste avec du CoA par l'acétyl-CoA synthase. Il existe deux types de thioestérases, FAT A et FAT B présentant des spécificités

différentes vis à vis de la structure des acyl-ACP. En effet, FAT A est utilisée pour couper le C18:0-ACP et le C18:1-ACP, alors que la FAT B est utilisée plus spécifiquement pour couper les ACP des chaînes courtes (< 18 carbones). Les études ont aussi reporté que FAT A est plus présente dans le plaste que FAT B, expliquant les teneurs élevées en C18:1 dans les graines oléagineuses (Bates *et al.*, 2013 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014). L'analyse de l'expression des ESTs codant pour les acyl-ACP-thioestérases (FAT A et FAT B) dans les graines de lin a montré une expression plus faible que celle des ESTs codant pour les KAS. Les ESTs codant pour les FAT ont été détectés majoritairement durant le stade torpille. L'abondance des ESTs pour ces gènes confirme un niveau d'expression élevée durant la phase d'embryogenèse (stade globulaire) pour ces gènes et majoritairement au niveau des téguments plutôt qu'au niveau de l'albumen (Venglat *et al.*, 2011).

#### 2.2.1.4. Les désaturases.

Les désaturases sont des enzymes clés permettant de convertir les acides gras saturés (C-C) en acides insaturés (C=C) en ajoutant une liaison à un carbone spécifique. Il existe deux familles de désaturases : les désaturases solubles et les désaturases membranaires (Bates *et al.*, 2013 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014 ; Rajwade *et al.*, 2014).

Les désaturases solubles utilisent, comme substrat carboné, les acyl-ACP produits lors de la synthèse *de novo*. La  $\Delta$ -9-stéaroyl-ACP-désaturase (FAB 2/SAD) permet d'ajouter une double liaison au niveau du carbone 9 du C18:0-ACP pour produire de l'acide oléique (C18:1). Les désaturases membranaires permettent d'introduire une double liaison sur les acides gras estérifiés à un CoA ou à celui lié à la moitié du glycérol des glycérolipides. Parmi ces désaturases, la  $\Delta$ -12 désaturase (FAD 2) permet l'ajout d'une double liaison sur le carbone 12 de l'acide oléique (C18:1), formant l'acide linoléique (C18:2). L'acide linoléique (C18:3) est formé par l'introduction d'une autre double liaison sur le carbone 15 de l'acide linoléique par la  $\Delta$ -15 désaturase (FAD 3). Dans les graines de lin, la SAD est codée par deux isoformes (SAD 1 et SAD 2) (Jain *et al.*, 2000). Le gène *FAD 2* présente deux copies (*FAD 2* ; *FAD 2-2*) (Fofana *et al.*, 2006) et la *FAD 3* est codé par 3 gènes (*FAD 3A* ; *FAD 3B* ; *FAD 3C*) (Vrinten *et al.*, 2005 ; Banik *et al.*, 2011). Une étude de Rajwade et collaborateurs en 2014, portant sur les graines de lin présentant des teneurs différentes en C18:3, a montré que les teneurs en acide linoléique étaient indépendantes de l'activité d'une seule enzyme, mais résultaient de l'activité coordonnée des 3 désaturases. En effet, les trois désaturases

impliquées sont la FAD 2-2, la FAD 3A et la FAD 3B. L'expression différentielle de SAD 2 n'a pas montré de différence de teneur en acide linoléique dans les graines de lin (Rajwade *et al.*, 2014).

L'analyse de l'expression des ESTs codant pour les désaturases a montré une expression débutant au stade torpille, augmentant au stade cotylédons et devenant très importante durant la phase de maturation. Le nombre des ESTs codant pour la  $\Delta$ -12 désaturase semble très important au stade torpille, alors que ceux codant pour les FAD 5, oméga-6-désaturase et oméga-3 désaturase semblent plus faibles. Les résultats de ces travaux ont clairement montré que l'expression se fait exclusivement dans les embryons (Venglat *et al.*, 2011). Ces résultats sembleraient montrer que la synthèse des acides linoléique s'effectue dans les embryons des graines de lin.

### **2.2.2. Formation des triglycérides.**

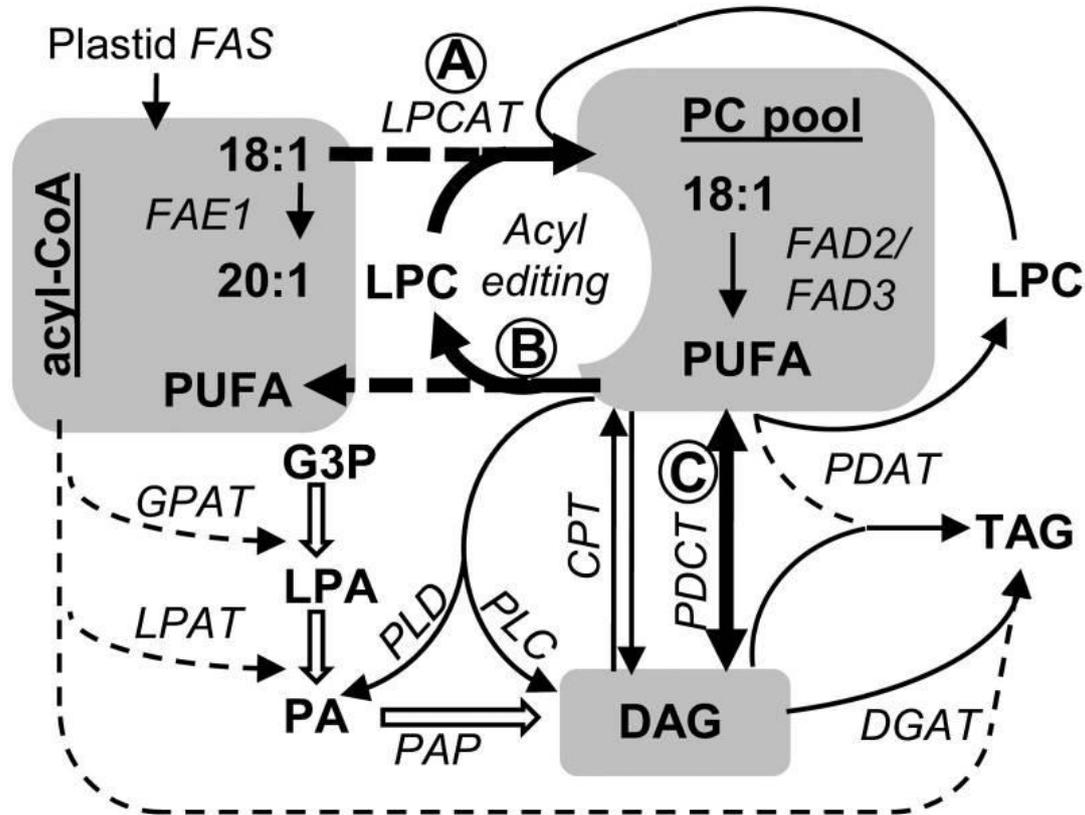
Les acides gras sont stockés à 90 % sous forme de triglycérides. Ces triglycérides (TAGs) sont composés de trois acides gras estérifiés sur un squelette de glycérol (G3P). Les TAGs sont la principale réserve lipidique des graines, des fruits et des grains de pollen. Dans les graines de lin, les TAGs peuvent représenter plus de 50 % de la matière sèche de la graine. Il existe plusieurs voies de biosynthèse des triglycérides (**Figure 15**) chez les plantes, mais la voie principale impliquée dans le transfert des acides gras vers les triglycérides est la voie Kennedy (Kennedy, 1961).

#### **2.2.2.1. La voie Kennedy.**

L'assemblage des acyls-CoAs produit lors de la synthèse *de novo* sur un squelette de glycérol-3-phosphate s'effectue au niveau du réticulum endoplasmique en trois étapes enzymatiques d'acylation pour former le TAG (**Figure 15**).

La première étape d'acylation correspond à l'intégration d'un premier acyl-CoA sur le squelette du glycérol-3-phosphate sn-1, par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT). Cette réaction permet la formation de l'acide lysophosphatidique (LPA). La lysophosphatidique acid acyltransférase (LPAAT) permet l'intégration d'un second acyl-CoA sur le LPA permettant la production de l'acide phosphatidique (PA). Ce complexe est alors déphosphorylé formant ainsi un diacylglycérol (DAG). Toutefois, un acyl-CoA peut également

se greffer sur la position sn-3 de la chaîne carbonée du DAG par l'intervention de la diacylglycérol acyltransférase (DAGAT) pour former le triglycéride (TAG) (Baud et Lepiniec 2010 ; Bates *et al.*, 2013 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014).



**Figure 15 : Réactions permettant la synthèse des triglycérides d'après Bates *et al.*, 2012.**

Les réactions de la synthèse *de novo* des glycérolipides sont représentées par les flèches blanches. Les réactions de transfert d'acyl sont représentées par des lignes en pointillés. Les réactions représentées en traits pleins correspondent aux réactions du squelette du glycérol. Les principales réactions (trait épais) commandant le flux d'acides gras du PC au TAG sont les suivantes : LPC : réaction d'acylation par LPCAT (A) ; PC réaction de désacylation par l'action inverse de LPCAT ou la phospholipase A (B) ; et l'interconversion de DAG et PC par PDCT- (C). Les substrats sont en caractères gras, les réactions enzymatiques sont en italique. FAD : acide gras désaturase ; FAS : acide gras synthase ; GPAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase ; APL : acide lysophosphatidique ; LPAT : acyl-CoA : LPA acyltransférase ; PA : acide phosphatidique ; PLC : phospholipase C ; PLD : phospholipase D.

Les analyses effectuées sur les gènes codant pour ces enzymes ont montré que ces enzymes ont une implication très importante pour l'accumulation des triglycérides (Vigeolas et Geigensberger, 2004 ; Vigeolas *et al.*, 2007 ; Baud et Lepiniec, 2010 ; Snapp et Lu., 2013 ; Van Erp *et al.*, 2014). Vigeolas et Geigensberger en 2004 ont montré que la quantité de G3P nécessaire à l'assemblage des TAG dans les graines matures limite la teneur en TAG dans les graines. La surexpression de la G3PDH conduisant à la conversion du DHAP en G3P a permis d'augmenter de 40 % la teneur en lipides dans les graines matures de colza (Vigeolas *et al.*,

2007) indiquant que la disponibilité de squelette glycérol était nécessaire ou pouvait être limitant à la synthèse des TAG. L'expression de gènes codant pour des LPAAT de levure dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* et de colza (*Brassica napus*) a engendré une augmentation de la teneur en huile dans les graines de colza de 13,5 % (Taylor *et al.*, 2001). La PDAT et la DGAT catalysant l'étape finale de l'assemblage du TAG par l'acylation de la position sn-3 du DAG sont considérées comme les deux principales enzymes influençant considérablement l'accumulation d'huile dans les graines (Zhang *et al.*, 2009 ; Snapp *et al.*, 2013). L'expression de *DGAT* est faible dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* et pourrait être un frein à l'accumulation des acides gras dans les triglycérides (Van Erp *et al.*, 2014). La sur-expression de *DGAT1* d'*Arabidopsis thaliana* dans les feuilles de tabac a engendré une augmentation de 7 fois la quantité de TAGs par rapport au témoin non transformé (Bouvier-Navé *et al.*, 2000). La sur-expression de ce même gène *DGAT1* a engendré une augmentation de 14 % de la teneur en huile dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* (Jako *et al.*, 2001) et de colza (Weselake *et al.*, 2008 ; Taylor *et al.*, 2009) et de 21 % dans les grains de maïs (Zheng *et al.*, 2008). L'expression du gène *DGAT1* semble être un facteur clé pour l'accumulation des huiles, mais pas déterminant. La mutation de *DGAT1* dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* a provoqué une diminution de 25 % de la teneur en huile dans les graines (Katavic *et al.*, 1995). L'expression de *DAGT2A* de *Umbelopsis ramaniana* a conduit à une augmentation de seulement 1,5 % de la teneur en huile dans les graines de soja (Lardizabal *et al.*, 2008).

L'analyse transcriptomique de ce mutant *DGAT1* a montré que l'expression de *PDAT1* est augmentée de 65 %, alors que l'expression de *PDAT2* n'a été augmentée que de 15 %, indiquant que c'est l'expression de *PDAT1* qui semblerait responsable de 75 % de la production en huile chez le témoin (Zhang *et al.*, 2009 ; Xu *et al.*, 2012). L'analyse du double mutant *DGAT1/LPCAT2* a montré une diminution de 65 % de la teneur en huile dans les graines d'*Arabidopsis thaliana*. Les chercheurs ont suggéré que la synthèse des triglycérides par PDAT1 en absence de DGAT1 nécessite une re-acylation de LPC par la LCPA2, fournissant des substrats permettant l'accroissement du pool de DAG (Xu *et al.*, 2012 ; Snapp *et al.*, 2013).

L'analyse des ESTs codant pour des DGAT indique que leurs expressions débutent dès le stade cordiforme dans les embryons de lin. L'expression diminue dans les embryons au niveau des stades plus tardifs de maturation. Aucune expression de ces ESTs *DGAT* n'a été

observée dans l'albumen aux stades globulaire et torpille alors qu'ils sont exprimés dans les téguments à ces mêmes stades (Venglat *et al.*, 2011).

#### 2.2.2.2. Les voies alternatives.

Des voies alternatives (**Figure 15**) permettent la synthèse des TAGs à partir des acyl-CoA. Ces voies alternatives sont connectées à la voie de biosynthèse des lipides membranaires. En effet, le DAG, produit par la déphosphorylation du PA, peut alors être utilisé pour former les phosphatidylcholines (PC) par la CDP-choline : 1,2-sn-diacylglycerol choline phosphotransferase (CPT). La modification de la chaîne carbonée par action de désaturases (FAD2, FAD3) et d'élongases a lieu sur les acyls de ces PC. Ces acyls peuvent alors être réorientés vers le pool d'acyl-CoA par l'action de phospholipase de type A en position sn-1 et sn-2 de la PC. Les acyls modifiés sont alors transférés du PC au DAG puis vers le TAG par trois voies enzymatiques (**Figure 15**):

- La PDCT (phosphatidylcholine : diacylglycérol choline phosphotransférase) permet un échange de phosphocholine entre le PC et le DAG (Lu *et al.*, 2009).
- L'activité réversible de la CPT (Bates *et al.*, 2013).
- Un mécanisme de lipases utilisant une phospholipase C, ou une phospholipase D plus du PAP (Bates *et al.*, 2013 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014).

### 2.3. La biosynthèse des composés glucidiques.

#### 2.3.1. Biosynthèse de l'amidon.

L'amidon est un polymère de glucose synthétisé à partir du pool de glucose-6-phosphate dans les plastes des embryons. La synthèse de l'amidon s'effectue à partir du glucose-6-phosphate qui est converti en ADP-glucose par la phosphoglucomutase et l'hexose isomérase. L'amidon synthase permet le branchement des molécules de glucose sur la structure glucan par une liaison  $\alpha$ -1-4. L'enzyme branchante permet le branchement des molécules de glucose en 1 $\rightarrow$ 6 (**Figure 16**). L'analyse des enrichissements isotopiques de l'amidon après culture d'embryons en présence de substrat marqué a permis d'identifier par la connaissance des flux métaboliques plastidiaux la présence ou non d'un transporteur de glucose-6-phosphate entre le cytosol et le chloroplaste (Koubaa *et al.*, 2014).





galactosyltransférases et des arabinosyltransférases (Caffall et Mohnen, 2009). Certaines enzymes hydrolytiques comme la  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -L-arabinofuranosidase codée par *AtBXL1* et la glycosyl transférase codée par *MUM2* (MUCILAGE-MODIFIED2) modifieraient à posteriori les chaînes de RGI directement dans l'apoplasme (Arsovski *et al.*, 2010).

#### 2.3.2.2. Les arabinoxylanes (AX).

Les arabinoxylanes (AX) appartiennent au groupe des polysaccharides faisant partie de la famille des xylanes. Les xylanes sont des hémicelluloses constituant les parois primaires et secondaires des monocotylédones (Caffal et Monhen, 2009). Les AX (**Figure 17**) sont composés d'une chaîne linéaire de xyloses liés en  $\beta$ -(1-4) avec des substitutions d'arabinoses liées en  $\alpha$ (1-3) et/ou  $\alpha$ (1-2) et pouvant présenter des substitutions de D-galactose, de L-fucose et de résidus, pour la plupart, non terminaux, non réducteurs. Dans le mucilage séminal du lin, ces AX semblent présenter beaucoup plus de ramifications que ceux présents dans les parois des végétaux (Guilloux *et al.*, 2009). La formation du squelette de xyloses lié en  $\beta$ -(1-4) s'effectue par des (1-4)- $\beta$ -xylosyltransférases utilisant de l'UDP-xylose comme substrat. Les substitutions peuvent être faites par des arabinosyltransférases (Izydorczyk et Dexter, 2008).

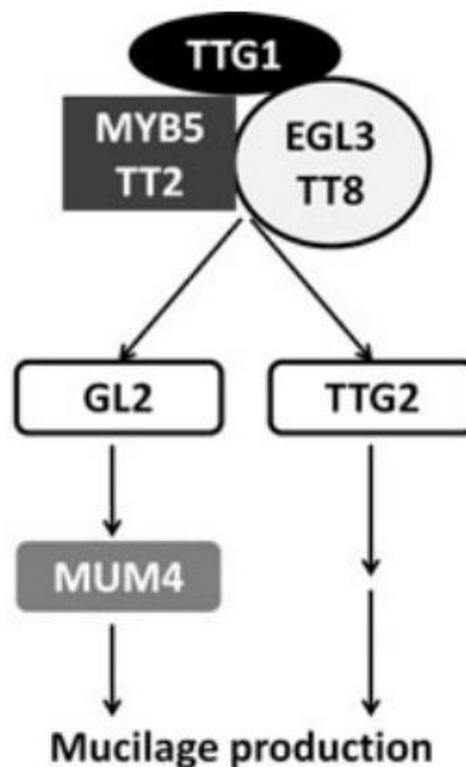
Dans les graines de lin, les ESTs codant pour les rhamnose synthases et les  $\beta$ -xylosidases ont montré des expressions spécifiques dans les téguments des graines de lin durant le stade globulaire et le stade torpille (Venglat *et al.*, 2011).

#### 2.3.3. Relation entre production d'huile et synthèse de mucilage - régulation.

L'analyse d'un mutant *gl2* (*glabra 2*) de la famille (HD-ZIP) codant pour un facteur de transcription homéodomaine (HD) chez *Arabidopsis thaliana*, a révélé une déficience dans la biosynthèse du mucilage au niveau du tégument (Shen *et al.*, 2006 ; Shi *et al.*, 2012). Ce mutant présente des teneurs en huile plus élevées de 8 % comparées à celles du témoin non transformé. Les études d'Ohashi *et al.* (2003) et de Shi *et al.* (2012) ont également suggéré que *GL2* pouvait réguler négativement la *PHOSPHOLIPASE D ZETA* (*PLDZ*). Toutefois, l'analyse des mutants simple et double de *pldz1* et *pldz2* n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives en terme de teneur en huile par rapport au témoin,

suggérant que *PLDZ* ne joue pas un rôle dans la biosynthèse et l'accumulation des huiles (Shi *et al.*, 2012).

Dans le mutant *gl2*, il semble que *MUM4* (*MUCILAGE MODIFIED 4*) codant pour une rhamnase synthase, une enzyme de la voie de biosynthèse du mucilage soit sous-exprimé. Les mutants *ttg1*, *ttg2*, *myb5*, *tt2*, *egl3*, *tt8* et *mum4*, gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du mucilage, présentent tous une teneur plus importante en huile dans leurs graines suggérant que le phénomène est lié à une plus grande disponibilité de carbone en l'absence de mucilage (Western *et al.*, 2004 ; Gonzalez *et al.*, 2009 ; Shi *et al.*, 2012). Shi et collaborateurs (2012) s'appuient sur cette hypothèse pour expliquer que dans le cas de l'absence de synthèse de mucilage dans les mutants *gl2* et *mum4*, le saccharose normalement utilisé pour la production de mucilage est redirigé vers l'albumen et l'embryon pour la biosynthèse des huiles.



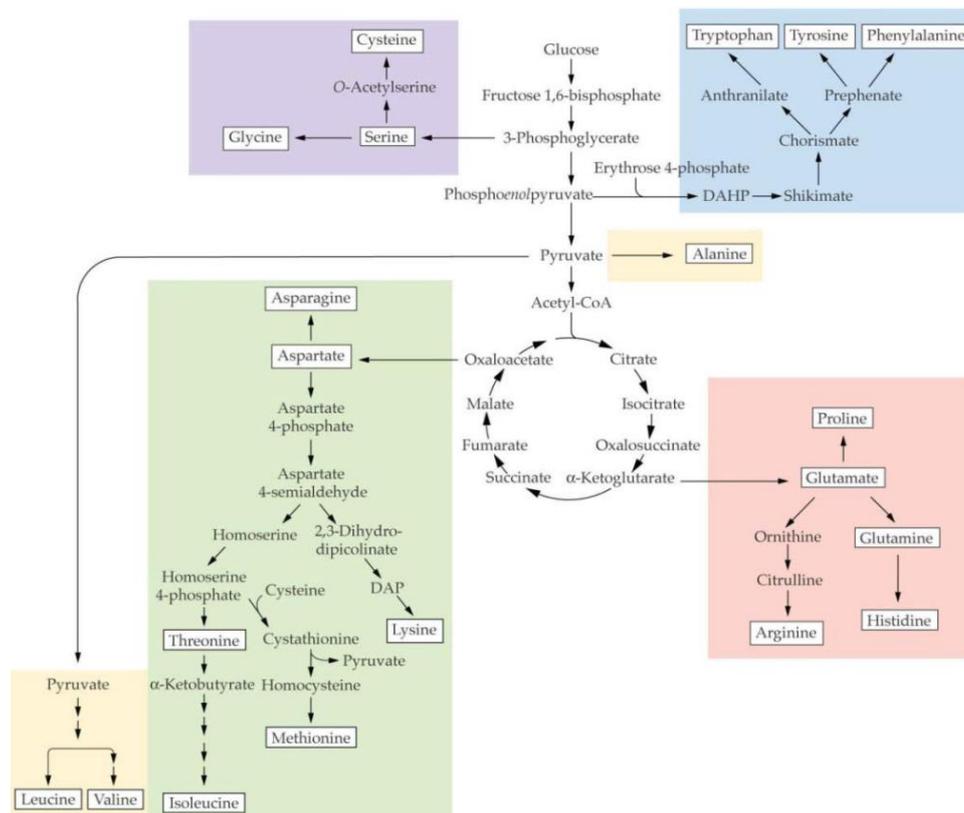
**Figure 18 : Modèle de régulation de la synthèse du mucilage chez *Arabidopsis thaliana* (Shi *et al.*, 2012).**

L'analyse de ces mutants a permis d'identifier, dans les téguments des graines, la régulation de *GL2* par le complexe protéique bHLH Glabra3 (*EGL3*) ou Transparent testa 8 (*TT8*) et *AP2*. La protéine *MYB5* ou *Transparent testa 2* (*TT2*), ainsi que *TTG1* sont des

facteurs importants pour la régulation de la synthèse du mucilage (**Figure 18**) (Zhang *et al.*, 2003 ; Bernhardt *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2009).

#### 2.4. La synthèse des acides aminés.

Les protéines des graines de lin sont composées d'acides aminés synthétisés durant la phase de maturation de la graine et plus particulièrement entre 16 et 48 JAF. Les acides aminés sont une classe de composés possédant sur leur carbone  $\alpha$  des fonctions amines ( $-NH_2$ ) et acides ( $COOH$ ), un hydrogène et un radical R. Les acides aminés sont classés en différentes catégories suivant la propriété de leur chaîne latérale R. Les voies de biosynthèse des acides aminés sont maintenant bien connues chez les plantes. Elles s'effectuent à partir d'un nombre limité de métabolites provenant des réactions de la glycolyse et du cycle de Krebs (**Figure 19**).



**Figure 19 : Représentation des voies de synthèse des famille d'acides aminés (Buchanan *et al.*, 2000).**

Selon le précurseur carboné nécessaire à la synthèse des acides aminés, on distingue plusieurs familles d'acides aminés : famille du glutamate (glutamine, arginine, proline), famille de l'aspartate (asparagine, thréonine, méthionine, lysine), famille du pyruvate

(valine, leucine, alanine, isoleucine), famille de la sérine (glycine, sérine, cystéine), famille du shikimate (tyrosine, phénylalanine, tryptophane) et de l'histidine (Szyperski, 1995 ; Fowler *et al.*, 2008 ; Berg *et al.*, 2013).

La synthèse des acides aminés nécessite de l'énergie (ATP) et des réactions de transaminations catalysées par des aminotransférases qui assurent le transfert de groupement amine entre les acides aminés et les acides  $\alpha$ -cétonique. La synthèse des acides aminés serait régulée par la lumière, la disponibilité en sucres, certains acides aminés (glutamine) ou encore en nitrate (Morot-Gaudry *et al.*, 2001).

#### **2.4.1. Biosynthèse des acides aminés de la famille du glutamate.**

Le glutamate et la glutamine sont deux acides aminés clés permettant la synthèse d'autres acides aminés (la proline et l'arginine). Ces acides aminés proviennent du glutamate qui peut être formé soit par le cétooglutarate par la glutamate déshydrogénase soit par la glutamine par la glutamate synthase (GOGAT). La molécule de glutamate produite permet la synthèse de deux acides aminés non essentiels, la proline et l'arginine par des étapes d'amidation et de réduction et sont synthétisés dans le cytosol (Fowler *et al.*, 2008 ; Berg *et al.*, 2013). Le glutamate et l'arginine font parti des trois acides aminés majoritaires présents dans les graines de lin et sont synthétisés durant la phase de synthèse des acides gras (Chung *et al.*, 2005; Czemplik *et al.*, 2011). Bien qu'aucune analyse des flux métaboliques n'ait été entreprise dans les embryons de lin, ces résultats indiqueraient un flux de carbone important provenant de la glutamine ou du glucose pour la synthèse de ces composés. L'analyse des flux métaboliques dans les embryons de lin permettrait ou non de confirmer l'hypothèse qu'un flux de carbone important passe au niveau du cycle de Krebs pour la synthèse de l'arginine et du glutamate.

#### **2.4.2. Biosynthèse des acides aminés de la famille de l'aspartate.**

L'aspartate est un des trois acides aminés majoritaires dans les graines de lin et synthétisé majoritairement au cours de la phase de synthèse des acides gras dans les graines (Chung *et al.*, 2005; Czemplik *et al.*, 2011). L'aspartate est synthétisé à partir de la transamination du glutamate et de l'oxaloacétate (**Figure 19**). Bien qu'aucune analyse de flux métabolique n'ait été entreprise dans les embryons de lin, la teneur élevée de l'aspartate dans les graines de lin semblerait indiquer qu'un flux de carbone pourrait provenir du cycle de Krebs et de

l'oxaloacétate dans les embryons de lin. L'aspartate permet la formation de l'asparagine, la thréonine, l'isoleucine, la méthionine et la lysine. La synthèse de l'asparagine est effectuée par une réaction d'amidation activée par l'hydrolyse de l'ATP par l'asparagine synthétase. Cette réaction est chimiquement analogue à la synthèse de la glutamine à partir du glutamate.

Après phosphorylation et réduction de l'aspartate par l'aspartate kinase I et l'aspartate semialdéhyde synthase, celui-ci est converti en semialdéhyde aspartate. Ce dernier est soit réduit en homosérine par l'homosérine déshydrogénase I et II, soit condensé au pyruvate pour former la dihydropicolinate par la dihydrodipicolinate synthase. L'homosérine est alors réduite par l'homosérine kinase puis isomérisé par la thréonine synthase pour former la thréonine ou être utilisé dans la synthèse de la méthionine par l'action successive de l'homosérine succinyl transférase, le cystathionine  $\beta$ -lyase et de l'homocystéine méthylase. Le dihydropicolinate produit par la dihydrodipicolinate synthase permet la formation de la lysine par des étapes de réductions successives (Fowler *et al.*, 2008 ; Berg *et al.*, 2013).

#### **2.4.3. Biosynthèse des acides aminés de la famille du pyruvate.**

La synthèse de l'alanine, la valine, la leucine et l'isoleucine nécessite comme précurseur le pyruvate chloroplastique qui est également le précurseur de l'acétyl-CoA chloroplastique assurant la synthèse des acides gras. La synthèse de l'alanine nécessite une seule réaction de transamination du pyruvate alors que celle de la valine, leucine et isoleucine fait intervenir plusieurs étapes de condensation, de transamination, de décarboxylation. La synthèse de l'isoleucine débute par la désamination de la thréonine (synthétisé à partir de l'aspartate) en 2-oxobutyrate. La condensation de ce composé à une molécule de pyruvate permet la synthèse de  $\alpha$ -hydroxybutyrate qui conduit à la synthèse de l'isoleucine (Fowler *et al.*, 2008 ; Berg *et al.*, 2013). La synthèse de la valine et de la leucine débute par la condensation de deux molécules de pyruvate par l'acétolactate synthase pour former l'acétolactate. Ce composé peut former soit la valine par une étape de transamination, soit l' $\alpha$ -isopropylmalate (précurseur de la synthèse de la leucine) par l'incorporation d'un groupement méthyl via l'acétyl-CoA. L' $\alpha$  isopropylmalate donne le  $\beta$ -isopropylmalate après une étape d'isomérisation. La décarboxylation de ce composé produira l' $\alpha$ -cétoisocaproate qui après une étape de transamination produira la leucine (Fowler *et al.*, 2008 ; Berg *et al.*, 2013). L'analyse des enrichissements isotopiques de ces

acides aminés après culture des embryons en présence de substrats marqués permet d'évaluer l'état d'enrichissement du pyruvate plastidial pour le calcul des flux métaboliques (Schwender *et al.*, 2004 & 2006).

#### **2.4.4. Biosynthèse des acides aminés de la famille de la sérine.**

La biosynthèse des acides aminés de la famille de la sérine (glycine, sérine, cystéine) s'effectue à partir d'un précurseur commun, le 3-phosphoglycérate chloroplastique (**Figure 19**). L'oxydation du 3-phosphoglycérate par la phosphoglycérate déshydrogénase conduit à la synthèse du 3-phosphohydroxypyruvate. Ce dernier, après avoir subi une étape de transamination par la phosphosérine phosphatase, est transformé en 3-phosphosérine, précurseur de la synthèse de la sérine. La sérine permet la synthèse de deux autres acides aminés, la cystéine et la glycine (Fowler *et al.*, 2008 ; Berg *et al.*, 2013).

La cystéine est produite par l'incorporation d'un groupement méthyl et d'un groupement de sulfure d'hydrogène (-SH) par la sérine acétyltransférase et la O-acétylsérine-lyase. La glycine est produite par l'action de la glycine hydroxyméthyltransférase (Fowler *et al.*, 2008 ; Berg *et al.*, 2013). L'analyse des enrichissements isotopiques de ces acides aminés, après culture des embryons en présence de glucose marqué, sert à évaluer l'état d'enrichissement du phosphoglycérate plastidial. Ces données sont utilisées pour le calcul des flux métaboliques et l'évaluation des échanges entre le compartiment cytosolique et plastidial à ce niveau (Schwender *et al.*, 2004 & 2006).

#### **2.4.5. Biosynthèse des acides aminés de la famille du shikimate.**

La tyrosine, la phénylalanine et le tryptophane sont synthétisés à partir d'un précurseur commun, le shikimate (**Figure 19**). Le shikimate est formé à partir du la 3-désoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DHAP). Cette molécule est synthétisée par une condensation de l'érythrose 4-P et du phosphoénolpyruvate par la 3-désoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase (DHAP synthase).

Après transformation du shikimate en chorismate par la chorismate synthase, le chorismate peut être utilisé soit pour la formation du préphénate, précurseur de la phénylalanine et la tyrosine, soit à la formation de l'antranilate, précurseur du tryptophane (Fowler *et al.*, 2008 ; Berg *et al.*, 2013).

La synthèse du tryptophane à partir de l'anthralinate s'effectue en cinq étapes par l'anthranilate-phosphoribosyl-transférase, la phosphoribosylanthranilate isomérase, la synthétase indoleglycérolphosphate et la tryptophane synthase. Cette dernière enzyme induit la condensation de l'indole sur la sérine pour la formation du tryptophane.

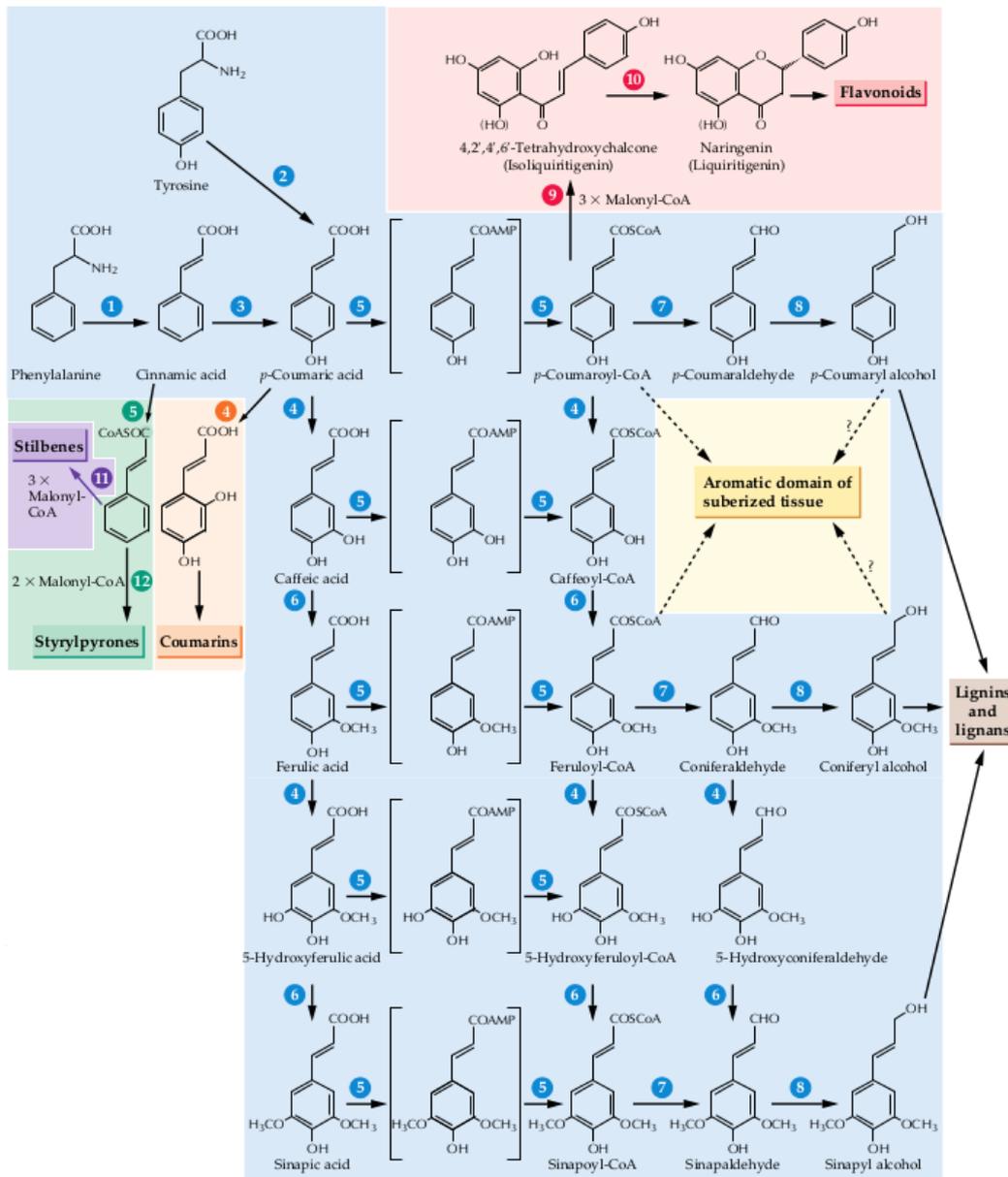
La phénylalanine est formée à partir du préphénate par deux étapes enzymatiques. La préphénate déshydratase permet la synthèse du phénylpyruvate puis l'action d'une transaminase en présence de glutamate conduit à la formation de la phénylalanine. La synthèse de la tyrosine est effectuée à partir du préphénate par deux étapes enzymatiques. La préphénate déshydrogénase assure la synthèse de la p-hydroxyphénylpyruvate par oxydation du préphénate qui après transaminasation avec le glutamate permet la formation de la tyrosine (Fowler *et al.*, 2008 ; Berg *et al.*, 2013). La phénylalanine et la tyrosine sont à l'origine de la synthèse des composés phénoliques présents en grande quantité dans les graines de lin (Venglat *et al.*, 2011).

#### **2.4.6. Biosynthèse de l'histidine.**

La biosynthèse de l'histidine s'effectue à partir de la ribose-5-phosphate qui forme le 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) par l'action de la ribose phosphate pyrophosphokinase (**Figure 19**). Le PRPP est ensuite conjugué à de l'ATP par l'ATP phosphoribosyl transférase pour former le phosphoribosyl-ATP. La libération de pyrophosphate par la phosphoribosyl ATP pyrophosphatase et l'incorporation d'une molécule d'eau par la phosphoribosyl AMP cyclohydrolase permet l'ouverture du cycle du ribose et la formation de phosphoribulosoylformimino-phosphate. Ce dernier après transamination du glutamate permet la formation de l'érythro-imidazol glycérol phosphate. La déshydratation de ce composé par l'imidazol glycérol phosphate déshydratase conduit à la formation d'imidazol acétole phosphate. L'histidinol phosphate est formé après une étape de transamination effectuée à partir du glutamate. Une étape de désphosphorylation et une étape de déshydrogénation sont suffisantes pour induire la formation de l'histidine (Fowler *et al.*, 2008 ; Berg *et al.*, 2013).

## 2.5. Biosynthèse des composés secondaires, les polyphénols.

Les différents composés phénoliques sont issus du métabolisme primaire et notamment de deux acides aminés aromatiques, la phénylalanine et la tyrosine. Ils ont un rôle de protection pour la graine contre les radiations, mais également d'attraction des prédateurs afin de permettre la dissémination de la graine dans l'environnement (Sarmi et Cheymer, 2006).



**Figure 20 : Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et des monolignols d'après Buchanan *et al.*, 2000**

Abréviations : PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase ; C3H : coumarate 3-hydroxylase ; 4CL : 4-coumarate-CoA ligase ; COMT : cafféate O-méthyltransférase ; CCoAOMT : cafféoyl-CoA O-méthyltransférase ; F5H : férulate 5-hydroxylase ; CCR : cinnamoyl-CoA réductase ; CAD : alcool cinnamylque déshydrogénase.

### 2.5.1. Biosynthèse des précurseurs des lignanes, les acides phénoliques.

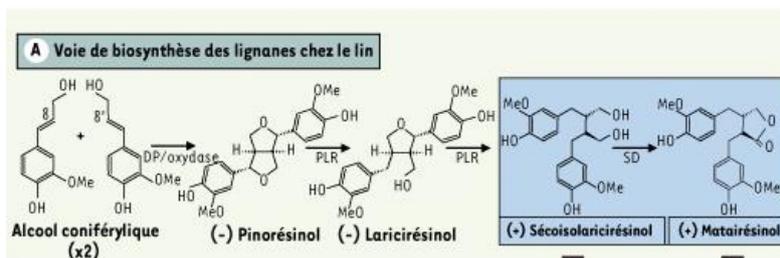
La synthèse des acides hydroxycinnamiques et leurs dérivés, s'effectue par les enzymes de la voie générale du métabolisme des phénylpropanoïdes qui débute par la désamination de la phénylalanine (PHE), par la phénylalanine ammoniac lyase (PAL). L'action de la PAL produit l'acide *trans*-cinnamique qui subira par la suite des étapes successives d'hydroxylation et de méthylation pour donner l'acide para-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide 5-hydroxyférulique et l'acide sinapique. La synthèse de ces composés est effectuée par trois mono-oxygénases à cytochrome P450, la cinnamate 4-hydroxylase (C4H), la p-coumarate 3-hydroxylase (C3H) et la férulate 5-hydroxylase (F5H) qui permettent l'ajout de groupements hydroxyles sur la chaîne carboné. La coumarate CoA ligase (4CL), une enzyme ATP-dépendante, permet la formation d'esters de CoA (p-coumaryol-CoA ; cafféoyl-CoA ; féruloyl-CoA ; 5-hydroxyféruloyl-CoA ; sinapoyl-CoA) à partir respectivement des acides para-coumarique, caféique, férulique, 5-hydroxyférulique et sinapique. Le p-coumaryol-CoA est un précurseur clé dans la synthèse de différents composés et notamment des flavonoïdes. La méthylation des groupements phénoliques est catalysée par deux O-méthyltransférases (OMTs), la caféoyl-CoA O-méthyltransférase (CCoAOMT) et la caféate O-méthyltransférase de classe I (COMTI).

La formation de l'alcool coniférylique, précurseur commun de la plupart des lignanes est effectuée par deux enzymes la cinnamoyl-CoA réductase (CCR) et la coniféraldéhyde déshydrogénase (CAD) quand le féruloyl-coA est utilisé comme précurseur. Ces deux enzymes réduisent le féruloyl-CoA par le NADHP.

### 2.5.2. Les lignanes.

Le sécoisolaricirésinol diglucoside (SDG) a pour formule moléculaire  $C_{32}H_{46}O_{16}$  (Stasevich *et al.*, 2009) et un poids moléculaire de 686,71 (Prasad, 1997). La synthèse de ce SDG s'effectue à partir de la condensation de deux alcools coniféryliques liés au niveau de leurs carbones 8 par une protéine dirigeante (DP) pour former le pinorésinol (**Figure 21**). Cette protéine contient un complexe multi-protéique (une protéine catalytiquement inactive, une laccase ou une peroxydase) permettant de fixer la forme radicalaire de l'alcool coniférylique de manière spécifique (Davin *et al.*, 1997). Bien que l'activité de cette protéine

n'ait jamais été démontrée chez le lin, plusieurs gènes candidats codant pour des protéines dirigeantes ont été trouvées (Venglat *et al.*, 2011).



**Figure 21 : Biosynthèse des lignanes chez le lin cultivé (*Linum usitatissimum*) d'après Lamblin *et al.*, 2008.**

DP : protéine dirigeante ; PLR : pinorésinol-laricirésinol réductase ; SD : sécoisolaricirésinol déshydrogénase.

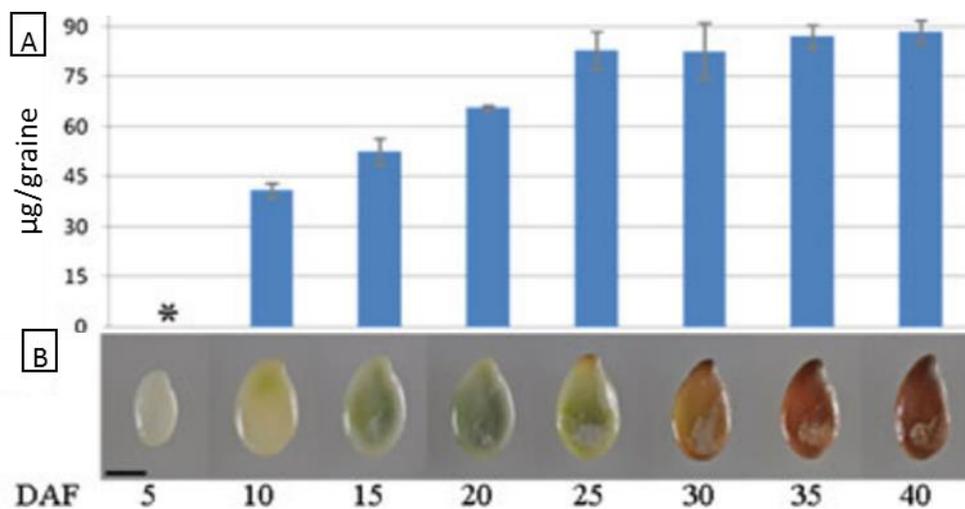
Le pinorésinol produit par la DP produira le laricirésinol puis le sécoisolaricirésinol par la pinorésinol laricirésinol réductase (PLR). Dans les graines de lin, il existe deux diastéréoisomères du sécoisolaricirésinol, la forme (+) sécoisolaricirésinol (99 %), et la forme (-) sécoisolaricirésinol (1 %). Ces deux diastéréoisomères sont synthétisés par deux PLR qui ont une énantiospécificité opposée :

- PLR1 utilise le (-) pinorésinol pour donner du (-) laricirésinol et du (+) sécoisolaricirésinol.
- PLR2 utilise le (+) pinorésinol pour donner le (+) laricirésinol et du (+) sécoisolaricirésinol.

Le sécoisolaricirésinol est ensuite glycosylé en SDG par la sécoisolaricirésinol diglycosyltransférase, puis lié aux unités de 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl (HMG) dérivées du 3-hydroxy-3-méthyl-glutarique (HMGA) (Ford *et al.*, 2001). La synthèse du SDG dans les graines de lin s'effectue durant la phase d'embryogenèse et durant la phase de maturation des graines de lin. En effet, les travaux réalisés par Fang *et al.* (2013) ont montré que la teneur en SDG est détectable dès 6 JAF et augmente progressivement dans les graines de lin jusqu'à 25 JAF (83,09 µg/graine) au moment où la dessiccation de la graine débute (**Figure 22**).

L'analyse de l'expression des ESTs codant pour des enzymes des voies de biosynthèse des lignanes a montré leur expression très importante au niveau des téguments durant les stades globulaire et torpille (phase d'embryogenèse). Plus précisément, une expression des

ESTs codant pour les enzymes impliquées dans les premières étapes (protéines dirigeantes) de la biosynthèse des lignanes a été observée au stade globulaire (Venglat *et al.*, 2011). Au stade torpille, l'abondance des ESTs codant pour des enzymes impliquées dans les dernières étapes de la voie de biosynthèse des lignanes comme, par exemple, ceux codant pour la pinoresinol-lariciresinol reductase devient très importante (Venglat *et al.*, 2011). Le gène codant pour l'enzyme de la biosynthèse du (-) sécoisolaricirésinol est exprimé dans la graine (Hemmati *et al.*, 2010) alors que celle de *LuPLR1* (pinorésinol laricirésinol réductase) a été détectée dans les téguments des graines de lin (Attoumbré *et al.*, 2010). Ces résultats sembleraient montrer que la synthèse du SDG s'effectue spécifiquement au niveau des téguments.



**Figure 22 : Teneur en SDG dans les graines de lin au cours de leur développement d'après Fang *et al.*, 2013.**

A : Evolution de la teneur en SDG dans les graines de lin au cours des phases d'embryogenèse et de maturation de la graine.

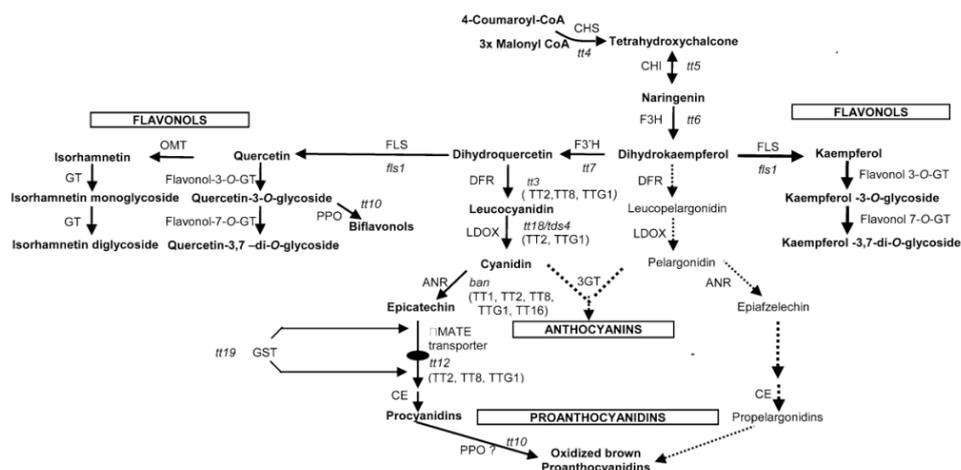
B : Photographie des graines de lin au cours de la phase d'embryogenèse et de maturation de la graine.

DAF : Jours après floraison

### 2.5.3. Les flavonoïdes.

La synthèse des flavonoïdes débute par la condensation de trois molécules de malonyl-CoA cytosolique et d'une molécule de p-coumaroyl-CoA qui sont respectivement originaires du métabolisme des sucres (glycolyse) et de la voie shikimate par la chalcone synthase (CHS) (**Figure 29**). La molécule de tétrahydroxychalcone produit par la CHS est alors isomérisée en naringénine par la chalcone isomérase (CHI). L'hétérocycle central de la naringénine produit est ensuite hydroxylé en position 3 par la flavonol 3-hydroxylase pour

donner le dihydrokaempférol. Celui-ci conduira à la formation soit des flavonols (kaempferol, quercetine, herbacétine) par la flavonol synthase (FLS), soit d'anthocyanidines par la flavonol 3'-hydroxylase (F3'H), la dihydroflavonol-4-reductase (DFR), la leucoanthocyanidines dioxygénase (LDOX). Les précurseurs des anthocyanidines peuvent également conduire à la formation de proanthocyanidines (tannins condensés) par l'anthocyanidine réductase (ANR), la glutathione S-transférase (GST) et l'enzyme de condensation (CE) (**Figure 23**). Les ESTs codant pour les enzymes clés des voies de biosynthèse des flavonoïdes (CHS, CHI, DFR) sont exprimés spécifiquement au cours du développement des graines de lin et majoritairement au niveau des téguments durant le stade globulaire et le stade torpille. Cette expression spécifique semblerait montrer une localisation de ces composées plus particulièrement au niveau des téguments des graines de lin.



**Figure 23 : Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes dans les graines d'Arabidopsis thaliana d'après Routaboul et al., 2006.**

ANR : anthocyanidin reductase; CE : condensing enzyme; CHI : chalcone isomerase; CHS : chalcone synthase; DFR: dihydroflavonol-4-reductase; F3H : flavonol 3'-hydroxylase; F3'H : flavonol 3'-hydroxylase; FLS: flavonol synthase; GST : glutathione S-transferase; GT : glycosyltransferase, LDOX : leucoanthocyanidin dioxygenase; OMT : methyltransferase.

L'analyse de mutant d'Arabidopsis thaliana altérant la production de flavonoïdes dans les graines a permis d'identifier 17 gènes codant pour des protéines structurales de la voie de biosynthèse des flavonoïdes (DFR, CHS, CHI, F3H, F3'H, LDOX, FLS1, ANR), des protéines de régulations de la voie de biosynthèse des flavonoïdes (TT1, TT2, TT8, TT16, TTG1, TTG2) et des protéines qui pourraient intervenir dans la compartimentation des flavonoïdes (TT12, TT19, AHA10, FLS) (Lepiniec et al., 2006 ; Ratoutaboul et al., 2006).

**Tableau V : Gènes altérant la production de proanthocyanidines dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* d'après Lepiniec et al., 2006.**

Le tégument de la graine d'*Arabidopsis thaliana* est brun.

Abréviations : P : proanthocyanidines (seulement dans les téguments) ; F : flavonols ; A : anthocyanines (seulement dans les parties végétatives). c graine brune durant une courte période. <sup>d</sup> aussi appelé anthocyanidine synthase (ANS). C : chalaze; M : micropyle.

Gènes	Couleur des téguments	Protéines produites	Composé(s) altéré(s)
<b>Gènes de structures</b>			
tt3	Jaune	Dihydroflavonol reductase (DFR)	P, A
tt4	Jaune	Chalcone synthase (CHS)	P, F, A
tt5	Jaune	Chalcone isomerase (CHI)	P, F, A
tt6	brun pâle	Flavanone-3-hydroxylase (F3H)	P, F, A
tt7	brun pâle	Flavanone-3-hydroxylase (F3H)	P, F, A
tt10	jaune foncé/brun (Cc)	Polyphenol oxydase (PPO)	P, F
tt12	brun pâle	MATE transporteur secondaire	P
tt15	Brun pâle/brun (CM)	Glycosyltransferase (GT)	P
tt18/ tds4/ tt11	Jaune	Leucocyanidin dioxygénase (LDOX) <sup>d</sup>	P, A
tt19/tt14	Jaune foncé	3 Glutathione S-transferase (GST)	P, A
ban	gris pâle/gris (CM)	Anthocyanidin reductase (ANR)	P
aha10	brun pâle	Autoinhibited H <sup>+</sup> -ATPase isoform 10	P
<b>Gènes régulateurs</b>			
tt1	Jaune/brune (CM)	Facteur de transcription WIP-type Zn-Finger P	P
tt2	Jaune	Facteur de transcription AtMYB123	P
tt8	Jaune	Facteur de transcription AtbHLH042	P, A
tt16 /abs	Jaune/brune (CM)	Facteur de transcription MADS AtAGL32	P
ttg1	Jaune	Protéine régulatrice ("WD40" or "WDR")	P, A
ttg2	Jaune	Facteur de transcription AtWRKY44	P
<b>Autres loci</b>			
tt9	gris pâle/noir (CM)	Inconnu	?
tt13	brun pâle	Inconnu	?
tt17	brun pâle	Inconnu	?
tds1,3, 5, 6	brun pâle	Inconnu	P
tds2	brun pâle	Inconnu	P, A

L'analyse de ces mutants a montré une altération de la couleur des téguments des graines provenant majoritairement d'une déficience de la production en proanthocyanidines, mais également en flavonols et en anthocyanines (**Tableau V**). Dans les graines de lin, la co-suppression de la chalcone synthase (CHS) a engendré une modification de la couleur du tégument de la graine de lin, passant de jaune à brune. L'analyse de ce

mutant a montré une augmentation très importante de la teneur en proanthocyanidine et en tannins hydrolysables (Zuk *et al.*, 2012).

**2.5.4. Modification de la teneur en acides gras dans les graines de lin - modifications génétiques de la voie de biosynthèse des composés phénoliques.**

De nombreux travaux de génie génétique sont menés pour étudier les relations existantes entre composés phénoliques et production d'acides gras en intervenant directement au niveau des enzymes de la voie de biosynthèse de ces composés secondaires (Lorenc-Kukula *et al.*, 2005 ; Zuk *et al.*, 2012). La modification de l'expression de trois gènes (CHS, CHI, DFR), impliqués dans la voie de biosynthèse des composés phénoliques, a non seulement augmenté la teneur en flavonoïdes mais également la teneur en huile de 20 % dans les graines de lin (Lorenc-Kukula *et al.*, 2005). Dans ce travail, la teneur totale en acides gras saturés est analogue à celle trouvée dans la lignée contrôle alors que la teneur en acides polyinsaturés a été augmentée. La teneur en acide linoléique (C18:2) a augmenté de 34 %. Ce résultat semblerait indiquer un effet régulateur de la synthèse des composés phénoliques sur la synthèse des acides gras dans les graines de lin. Les travaux de Zuk et collaborateurs en 2012 ont montré que la co-suppression de la CHS s'était accompagnée d'une augmentation de la teneur en acides gras polyinsaturés de 30 à 45 % dans les lins transgéniques. Cette augmentation s'est traduite principalement par la restauration de la synthèse d'acide linoléique conduisant à une accumulation de 30 à 34 fois plus de C18:3 que dans les graines de la plante contrôle un linola accumulant seulement 4 % C18:3. Dans ces plantes transgéniques, une augmentation d'un facteur 4 a été observée au niveau des tanins hydrolysables (Zuk *et al.*, 2012). Cependant, les teneurs en SDG ont augmenté de 10 %, celles des flavonols de 10 % et des acides phénoliques de 14 %, indiquant que la co-suppression de la CHS affecte partiellement la voie de biosynthèse des flavonoides mais influence fortement la biosynthèse des tannins et des phénylpropanoïdes. Les auteurs mentionnent qu'une des explications possibles à cette augmentation de la teneur en huile et notamment en C18:3 pourrait être liée à la restauration de l'activité désaturase. Une autre explication serait liée à la formation de complexes entre tannins et ions métalliques (fer, zinc, magnésium) qui pourrait permettre une activation de la *FAD3*. Toutefois, le mécanisme de régulation de la *FAD3* est encore mal compris.

### **CHAPITRE 3 : ROLE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET CONTROLE PHYSIOLOGIQUES DE L'ACCUMULATION DES HUILES DANS LES GRAINES.**

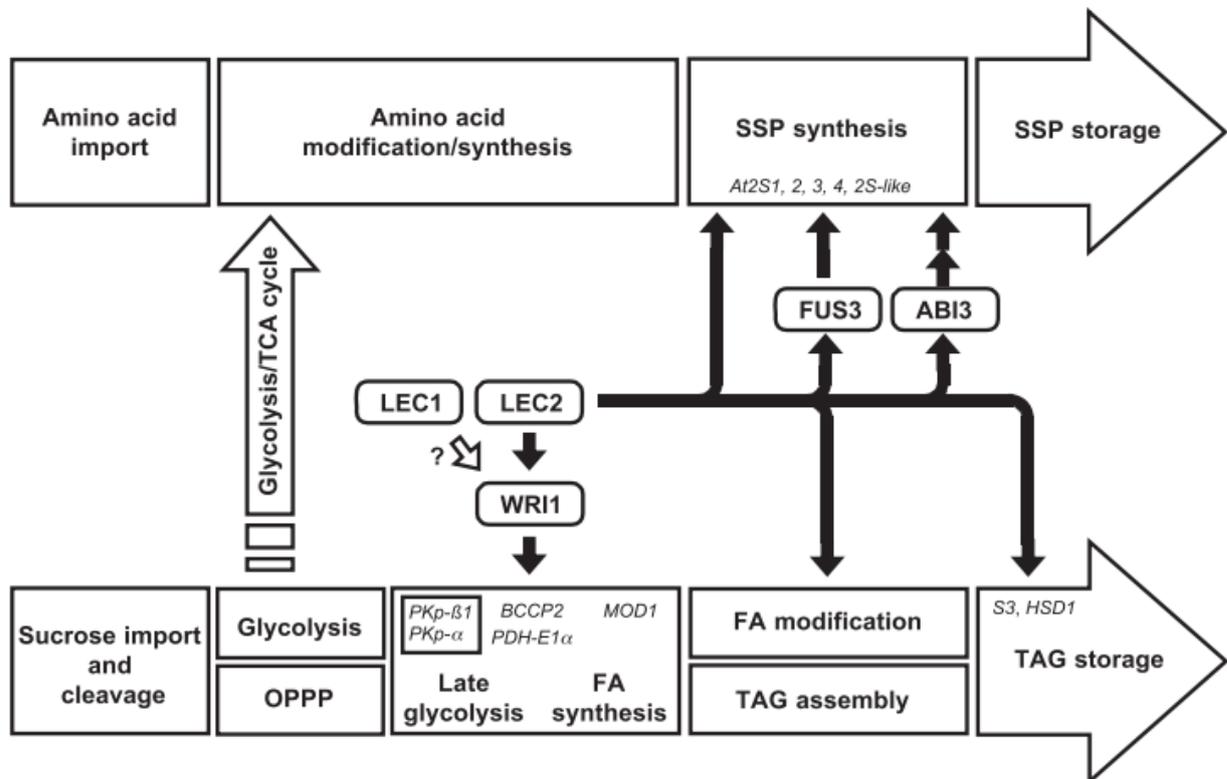
Les teneurs en huile dans les embryons de graines oléagineuses sont régulées par l'expression de gènes codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse des acides gras et d'enzymes du métabolisme carboné. L'expression de ces gènes est contrôlée par des facteurs de transcriptions et des facteurs physiologiques (Baud et Lepiniec, 2010). La connaissance de ces facteurs comme régulateurs de la teneur en huile, permet de comprendre les réseaux de régulations de ces gènes et d'identifier les gènes importants permettant de réguler l'accumulation d'huile dans les graines de plantes oléagineuses (Baud et Lepiniec, 2010).

#### **3.1. Le rôle des facteurs de transcription dans l'accumulation d'huile.**

##### **3.1.1. Rôle des facteurs de transcriptions régulant le passage de la phase d'embryogenèse à la phase de maturation.**

Le passage de la phase d'embryogenèse à la phase de maturation (accumulation des réserves) est régulé par de nombreux facteurs de transcription dans un processus complexe de régulation hormonale et de signalisation métabolique (Gutierrez *et al.*, 2007 ; Santos-Mendoza *et al.*, 2008). L'analyse de mutants affectés dans la phase de maturation a permis de définir quatre facteurs de transcription (ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (*ABIE3*), FUSCA3 (*FUS3*), LEAFY COTYLEDON 1 (*LEC1*), LEAFY COTYLEDON 2 (*LEC2*)) considérés comme les principaux régulateurs de l'embryogenèse et de la maturation des graines (Sidorov et Tsydendambaev, 2014). Trois de ces facteurs de transcription (*ABIE3*, *FUS3*, *LEC2*) présentent le domaine conservé de l'ADN binding B3, alors que *LEC1* code pour une sous unité de HAP3 de la CCAAT-box binding (Lotan *et al.*, 1998). L'analyse des mutants *fus3*, *abie3*, *lec1* et *lec2* a mis en évidence des altérations majeures au niveau de la maturation des graines, telles que la réduction de la teneur en huile dans les graines, l'absence de dégradation de chloroplaste, une accumulation d'anthocyanes et une intolérance à la dessiccation (Lotan *et al.*, 1998 ; Stone *et al.*, 2001 ; Kwong *et al.*, 2003 ; Gazzarrini *et al.*, 2004 ; Baud et Lepiniec, 2010). Inversement, la surexpression de ces gènes a conduit à une accumulation accrue d'huile dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* en régulant notamment l'expression de gènes codant pour des enzymes de la glycolyse, de la voie de biosynthèse des acides gras, de la formation et du stockage des TAGs et permettant de favoriser le flux de carbone pour la synthèse des

acides gras (Figure 24) (Baud *et al.*, 2007a ; Gutierrez *et al.*, 2007 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014).



**Figure 24 : Contrôle de l'accumulation des composés de réserves dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* au cours de la phase de maturation des graines d'après Santos-Mendoza *et al.*, 2008.**

Abréviations : FA : acides gras ; OPPP : voie oxydative des pentoses phosphates ; SSP : protéines de stockage des graines ; TAG : triglycérides ; TCA cycle : cycle de Krebs.

### 3.1.1.1. LEAFY COTYLEDON 1 - LEC1.

Le développement et l'analyse phénotypique des plantes transgéniques contenant des mutations au niveau des loci de *LEC1* ont été utilisés pour caractériser le gène *LEC1*. Le mutant *lec1* d'*Arabidopsis thaliana* présente une graine déformée, un hypocotyle et des cotylédons réduits et un développement de trichomes sur la surface adaxial des cotylédons intolérant à la dessiccation. Les corps protéiques et lipidiques sont quasiment absents alors qu'il y a une accumulation de granules d'amidon dans les cotylédons (Meinke *et al.*, 1994). La surexpression de *LEC1* dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* a engendré une augmentation de la teneur en huile de 4,7 fois supérieure à celle obtenue dans la plante non transformée (Mu *et al.*, 2008). Cette augmentation a pu être liée à une augmentation de l'ordre de 60 % de l'expression de gènes codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse

des acides gras, de gènes codant pour des désaturases (la  $\omega$ -6 désaturase,  $\omega$ -3 désaturase), la FA élongase 1, six oléosines et des gènes codant pour des enzymes de la glycolyse (pyruvate kinase, pyruvate déshydrogénase) (Mu *et al.*, 2008). L'activation de l'expression de ces gènes pourraient permettre l'activation des voies de synthèse avec une répercussion sur une augmentation du flux de carbone vers la synthèse des acides gras (Weselake *et al.*, 2009 ; Baud et Lepiniec, 2010 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014). L'activation de l'expression de ces gènes et plus particulièrement de *LEC1* connu pour induire l'expression d'autres facteurs de transcriptions (*LEC2*, *FUS3*, *ABI3*, *WR11*) responsables de l'expression de gènes codant pour des enzymes de la glycolyse, du métabolisme des acides gras et de la formation des triglycérides pourrait conduire à l'activation de ces voies métaboliques (Mu *et al.*, 2008 ; Weselake *et al.*, 2009 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014).

La surexpression de *LEC1* dans d'autres plantes a également entraîné une augmentation de la teneur en huile dans les graines (Shen *et al.*, 2010 ; Baud et Lepiniec, 2010 ; Tan *et al.*, 2011). En effet, la surexpression de l'orthologue de *LEC1* de *Brassica napus* (*BnLEC1*) ou de son homologue *LEC1-LIKE* (*BnL1L*) a montré une augmentation jusqu'à 20 % de la teneur en huile dans les graines de colza transformé par rapport aux plantes non transformées (Tan *et al.*, 2011). Dans les grains de maïs, la surexpression de *LEC1* (*ZmLEC1*) a engendré une augmentation de la teneur en huile de 35 % avec des effets secondaires négatifs sur le développement de la plante (Shen *et al.*, 2010). En effet, la surexpression de *ZmLEC1* dans le maïs a entraîné une réduction du taux de germination mais également de la croissance végétative qui à l'échelle du champ pourrait engendrer des baisses de rendements par rapport à un maïs non transformé (Shen *et al.*, 2010).

#### 3.1.1.2. LEAFY COTYLEDON 2 - LEC2.

*LEAFY COTYLEDON 2* (*LEC2*) est un autre facteur de transcription majeur participant au contrôle du processus de développement de l'embryon (Sidorov et Tsydendambaev, 2014). Le mutant *lec2* d'*Arabidopsis thaliana* a été caractérisé par le développement de trichomes au niveau des cotylédons des graines, un hypocotyle allongé et une diminution des teneurs en protéines et en huile dans les graines de respectivement 15 % et 30 % (Meinke *et al.*, 1994 ; Angeles-Núñez et Tiessen, 2011). La présence de 140 % fois plus de saccharose, 5 fois plus d'amidon, 2 fois plus de glucose dans les graines matures du mutant *lec2* pourrait indiquer que *LEC2* contrôle l'expression d'enzymes clés du métabolisme

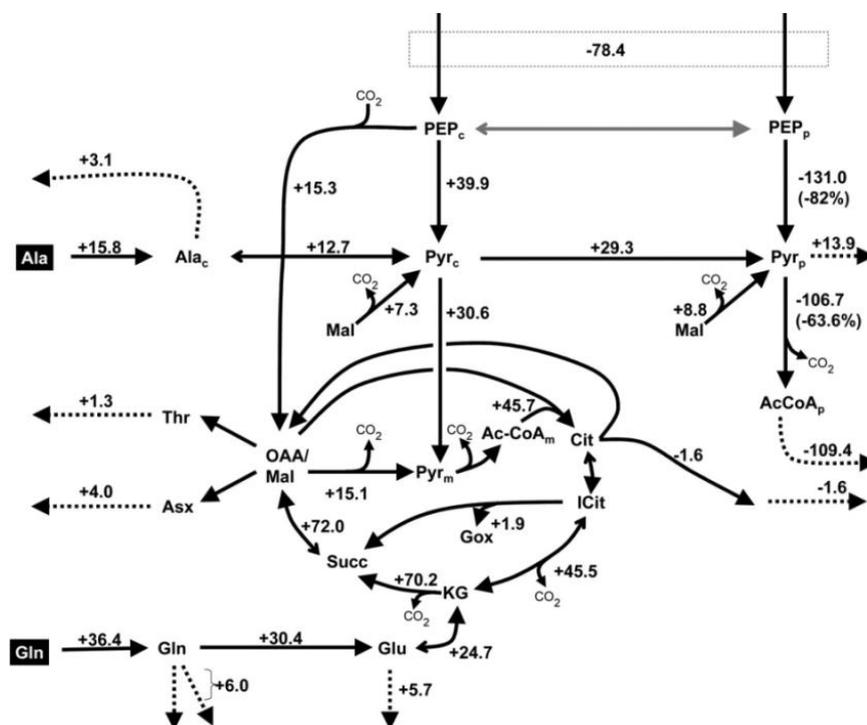
carboné permettant la conversion des sucres en acides gras et en protéines (Angeles-Núñez et Tiessen, 2011). *LEC2* appartient à la famille des facteurs de transcription B3, dont les membres contiennent une région de liaison du domaine B3 de l'ADN qui permet à *LEC2* de réguler l'expression de gènes possédant le site de reconnaissance de RY, présent notamment dans les promoteurs des gènes de l'oléosine (Kim *et al.*, 2002 ; Santos-Mendoza *et al.*, 2008; Stone *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2014). Les travaux ont montré que l'expression de *LEC2* permet également d'induire l'expression d'autres facteurs de transcriptions *LEC1*, *FUS3*, *ABI3* et *WRI1*, régulateurs de gènes du métabolisme carbonés et de l'accumulation d'acides gras (**Figure 24** ; To *et al.*, 2006 ; Baud *et al.*, 2007a ; Weselake *et al.*, 2009 ; Baud et Lepiniec, 2010 ; Kim *et al.*, 2014). L'expression de *LEC2* est également régulée positivement par un facteur de transcription *AGL15* (*AGAMOUS-LIKE15*) contenant le domaine MADS, qui régule également l'expression des facteurs *FUS3*, *ABIE3* (Braybrook *et al.*, 2006).

#### 3.1.1.3. WRINKLED 1.

Les analyses génétiques des gènes *LEC1* et *LEC2* ont montré que ces gènes pouvaient contrôler l'expression de *WRINKLED 1* (*WRI1*) (**Figure 24**). *WRI1* a été identifié comme un facteur de transcription de la famille de *APETALA2* (*AP2*) (Cernac et Benning, 2004). Le mutant *wri1* d'*Arabidopsis thaliana* est caractérisé par un tégument ridé et une diminution de la teneur en huile de 80 % s'accompagnant d'une augmentation de 10 % de celle en protéines dans ses graines (Focks et Benning, 1998 ; Lonien et Schwender, 2009). Les analyses transcriptomiques du mutant *wri1* ont montré que cette mutation a induit une diminution de l'expression de gènes codant pour des enzymes de la glycolyse (pyruvate kinase, pyruvate déshydrogénase, tréhalose-6-phosphate synthase), de ceux impliqués dans la biosynthèse des acides gras (ketoacyl-ACP synthase, acyl-ACP thioestérase et ACP) et de ceux responsables de la formation de biotine nécessaire pour l'ACCase et la PDH (Baud *et al.*, 2007b). En conséquence, les embryons en développement n'ont pas la capacité de produire de manière efficace les acides gras à partir du saccharose ou d'autres sucres (Cernac et Benning, 2004).

L'analyse des flux métaboliques dans les embryons du mutant *wri1* d'*Arabidopsis thaliana* (**Figure 25**) a montré que la diminution de la teneur en huile dans ces embryons est due à une diminution de 50 % de l'absorption de saccharose (précurseur de la synthèse des acides gras). Chez le mutant *wri1*, l'analyse des flux métaboliques a montré un blocage du

flux de carbone de la pyruvate kinase (PKp) (82 %) et de 63 % de la pyruvate déshydrogénase (PDH) indiquant que ces deux enzymes pourraient jouer un rôle très important dans le contrôle du flux de carbone pour la synthèse des acides gras. L'augmentation du flux de carbone entre la PKp et la PDH est due à une augmentation des importations du pyruvate cytosolique dans le compartiment plastidial par l'enzyme malique plastidique. L'analyse des flux métabolique du mutant *wri1* a également montré une absorption plus importante d'acides aminés (+ 32 %) et un flux de carbone plus important au niveau du cycle de Krebs conduisant à des teneurs plus élevées en protéines chez le mutant *wri1* par rapport aux plantes non transformé (Lonien et Schwender, 2009).



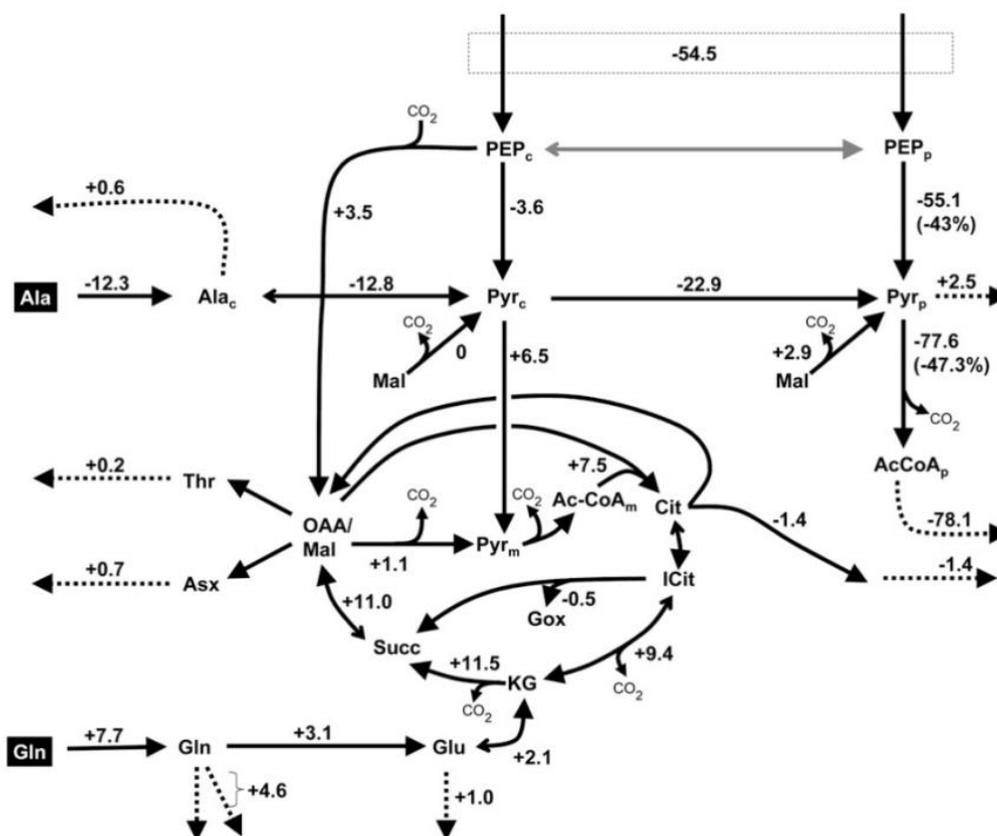
**Figure 25 : Différence du flux de carbone dans les embryons du mutant *wri1* et du témoin d'*Arabidopsis thaliana* d'après Lonien et Schwender, 2009.**

Abréviations : c : cytosolique ; p : plastidial ; m : mitochondriale ; PEP : phosphoenolpyruvate ; Pyr : pyruvate ; Mal : malate ; Ala : alanine ; Thr : thréonine ; Asx : chaîne carboné de l'asparagine ; Gln : glutamine ; Glu : glutamate ; KG : cétooglutarate ; Succ : succinate ; OAA : oxaloacetate ; ICit : isocitrate ; Cit : citrate ; CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone.

Dans le mutant *pkp* d'*Arabidopsis thaliana*, une diminution de la teneur en huile de 60 % a été observée (Baud *et al.*, 2007b ; André *et al.*, 2007). L'analyse des flux métaboliques chez le double mutant *pkpb1/pkpa* au niveau de la pyruvate kinase plastidial, a montré une diminution d'absorption de saccharose (43 %). Une diminution de 43 % et de 47,3 % du flux de carbone a été observée au niveau de la pyruvate kinase (PKp) et de la pyruvate

déshydrogénase (PDH) respectivement, confirmant que ces deux enzymes jouent un rôle clé dans la synthèse des acides et du contrôle du flux de carbone.

L'analyse des flux métaboliques, chez ce même double mutant *pkpb1/pkpa*, n'a pas montré d'augmentation des importations du pyruvate cytosolique vers le compartiment plastidial par l'enzyme malique plastidique. Ce comportement pourrait s'expliquer par une importation d'alanine et de glutamine moins importante et un flux de carbone au niveau du cycle de Krebs moins important que chez le mutant *wri1* (Figure 26) (Lonien et Schwender, 2009). Ces analyses montrent que, chez *Arabidopsis thaliana*, l'activité des enzymes du cycle de Krebs peut contribuer à augmenter le flux de carbone permettant une synthèse des acides gras plus importante (Lonien et Schwender, 2009).

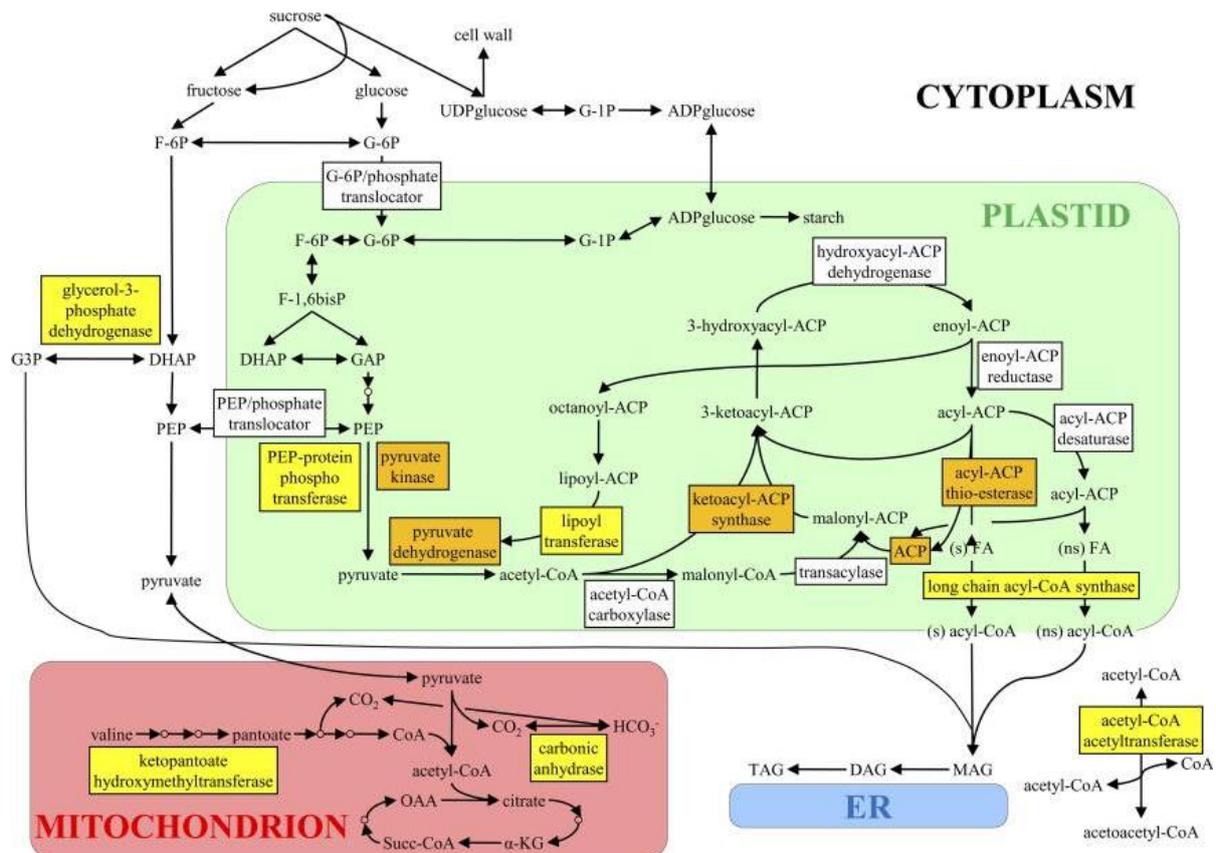


**Figure 26 : Différence du flux de carbone dans les embryons du double mutant *pkpb1/pkpa* et du témoin d'*Arabidopsis thaliana* d'après Lonien et Schwender, 2009.**

Abréviations : c : cytosolique ; p : plastidial ; m : mitochondriale ; PEP : phosphoenolpyruvate ; Pyr : pyruvate ; Mal : malate ; Ala : alanine ; Thr : thréonine ; Asx : chaîne carbonée de l'asparagine ; Gln : glutamine ; Glu : glutamate ; KG : cétylglutarate ; Succ : succinate ; OAA : oxaloacetate ; ICit : isocitrate ; Cit : citrate ; CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone.

L'analyse des orthologues de *WRI1* dans d'autres plantes tels que le colza, le maïs ou le palmier à huile a également montré que ces orthologues de *WRI1* sont des facteurs de

transcription très importants et identifiés pour affecter directement les teneurs en huiles (Liu *et al.*, 2009 ; Pouvreau *et al.*, 2011 ; Shen *et al.*, 2010 ; Dussert *et al.*, 2013). En effet, l'expression de l'orthologue de *WRI1* de colza dans *Arabidopsis thaliana* a permis d'augmenter de 10 % à 40 % la teneur en huile dans les graines transgéniques (Liu *et al.*, 2009) alors que la surexpression de *WRI1* dans les graines de maïs n'a engendré qu'une augmentation de l'accumulation d'huile de 10 à 22 % dans les graines (Shen *et al.*, 2010).



**Figure 27 : Fonctions métaboliques putatives des gènes cibles sur-exprimés par *ZmWRI1a* (Maïs) et *AtWRI1* (*Arabidopsis thaliana*) d'après Pouvreau *et al.*, 2011.**

Les gènes codant pour les enzymes du métabolisme carboné dont l'expression a été surexprimée par l'action de *ZmWRI1a* et d'*AtWRI1* sont référencés en orange. Les gènes codant pour les enzymes du métabolisme carboné qui sont surexprimés exclusivement par l'action de *ZmWRI1a* sont référencés en jaune. Les gènes codant pour les enzymes du métabolisme carboné qui sont surexprimés exclusivement par l'action de *AtWRI1* sont référencés en blanc.

Abréviations : DAG : diacylglycérol ; (ns) FA : acides gras non saturés ; (s) FA : acides gras saturés ; DHAP : dihydroacétone phosphate ; F-1,6bisP : fructose 1,6 bisphosphate ; F-6P : fructose-6-phosphate ; GAP : glycérol aldéhyde phosphate ; G-1P : glucose 1- phosphate ; G-6P : glucose 6-phosphate ; G3P : glycérol 3-phosphate ; MAG : monoacylglycérol ; TAG : triglycéride ; ACP : acyl carrier protein ; CoA : Coenzyme A ; PEP : phosphoenolpyruvate ; OAA : acide oxaloacétique ; CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone ; KG : céto-glutarate ; ER : réticulum endoplasmique.

Bien que l'analyse transcriptomique de la lignée surexprimant *ZmWRI1* dans le maïs a montré une similarité pour la surexpression des mêmes gènes putatifs (sous unités de la pyruvate kinase, pyruvate déshydrogénase, ketoacyl-ACP synthase, acyl-ACP thioestérase et

ACP) contrôlés par *WRI1* avec le modèle *Arabidopsis thaliana* (**Figure 27**, des différences entre les espèces ont été observées. En effet, chez la lignée surexprimant *WRI1* de maïs, les gènes cibles codant pour la glycérol-3-P-déshydrogénase, la lipoxyltransférase, l'acétyl-CoA synthase à longue chaîne sont activés par rapport au modèle *Arabidopsis thaliana* alors que les gènes codant pour le glucose 6P translocator, le PEP-P-translocator, l'acétyl-CoA carboxylase, la transacylase, l'hydroxyacyl-ACP déshydrogénase, l'enoyl-ACP réductase et l'acyl-ACP désaturase sur-exprimés chez *Arabidopsis thaliana* ne le sont pas chez le maïs.

Les études de mutants ou de surexpression de gènes ont montré que des facteurs de transcriptions permettaient d'augmenter la teneur en huile en contrôlant notamment l'expression d'enzymes clés de la glycolyse plastidiale. Parmi ces facteurs de transcription, *WRI1* semble être celui qui régule le plus la synthèse des acides gras. Toutefois, il a été montré que *WRI1* influence spécifiquement des enzymes clés de la glycolyse plastidiale telles que la pyruvate kinase mais a très peu d'influence sur l'expression des gènes impliqués dans l'assemblage des TAGs, un facteur important limitant la teneur en huile (Baud *et al.*, 2007b ; To *et al.*, 2012). Les gènes clés de l'assemblage des TAG sont codés par *DAGT1* et *SDP1* (Katavic *et al.*, 1995 ; Zhang *et al.*, 2009) et la surexpression de ces gènes a permis d'augmenter la teneur en huile dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* (Jako *et al.*, 2001). Récemment, une stratégie d'association multi-enzymes *WRI1*, *DGAT1* et *SDP1* a été testée afin d'augmenter le flux de carbone au niveau de la glycolyse et d'améliorer l'utilisation de ce carbone pour l'accumulation des acides gras. La surexpression de deux gènes *wri1*, *dgat1* et le blocage de l'expression de *SDP1* (Van Erp *et al.*, 2014) a permis d'augmenter de 7 à 10 % la teneur en huile dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* tout en diminuant respectivement de 3,4 % et de 0,4 % les teneurs en protéines et en saccharose. Les auteurs expliquent que la surexpression de *wri1*, de *dgat1* et le blocage de l'expression de *SDP1* n'a pas permis d'augmenter les teneurs en huile de manière additive. En effet, la production des huiles dans les graines dépend également de processus physiologiques à prendre en compte.

#### 3.1.1.4. FUSCA3

Le facteur de transcription *FUSCA3* (*FUS3*) est responsable de l'induction de la phase de maturation dans le développement de graines d'*Arabidopsis thaliana*. Ce facteur code pour une protéine *FUS3* qui reconnaît et se lie à l'élément CATGCA RY, une séquence présente dans les promoteurs de nombreux gènes (Curaba *et al.*, 2004 ; Santos-Mendoza et

*al.*, 2008). Le mutant *fus3* a montré un phénotype particulier avec un trichome au niveau des cotylédons et présente une intolérance à la dessiccation, une accumulation d'anthocyanes et de granules d'amidon et une diminution des corps protéiques et lipidiques (Meinke *et al.*, 1994 ; Harada, 2001). L'analyse de l'expression de *FUS3* dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* a montré que l'expression de ce facteur de transcription est corrélée à l'expression de gènes codant pour les deux types de protéines de stockage de graines (2S-albumine et 12S cruciférine), pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides gras (l'acétyl-CoA carboxylase, KAS I, KASII, KASIII) et pour une enzyme de la glycolyse, la pyruvate déshydrogénase (Wang *et al.*, 2007). L'expression de *FUS3* induit l'expression d'*ABI3*, un facteur de transcription exprimé exclusivement durant la phase de maturation et réprime celle du gène *TRANSPARENT TESTA GLABRA1 (TTG1)* identifié pour réguler la morphogénèse épidermique, la production de proanthocyanidine et la couleur du tégument de la graine. L'expression de *FUS3* est également induite par celle d'*ABI3* (Tsuchiya *et al.*, 2004 ; To *et al.*, 2006 ; Weselake *et al.*, 2009 ; Lepiniec *et al.*, 2006 ; Baud et Lepiniec, 2010).

#### 3.1.1.5. ABSCISIC ACID INSENSITIVE3.

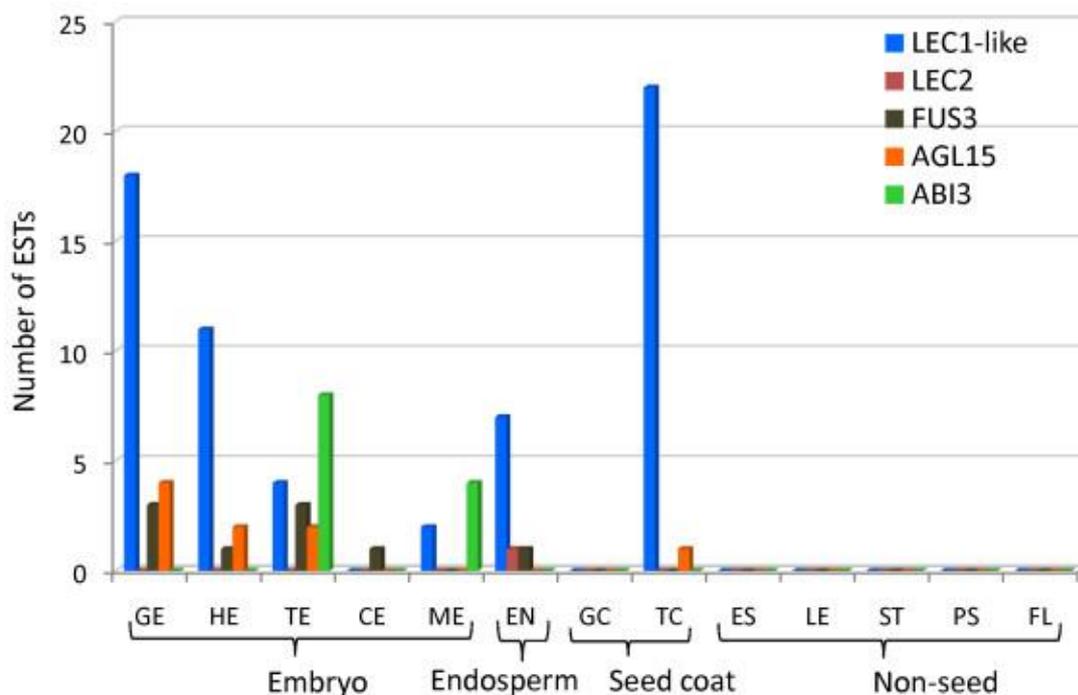
Le facteur de transcription *ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3)* participe comme *FUS3*, *LEC1* et *LEC2* au processus de formation de l'embryon (Santos-Mendoza *et al.*, 2008). Tout comme *FUS3* et *LEC2*, *ABI3* contient également un domaine de liaison B3. L'analyse phénotypique du mutant *abi3* d'*Arabidopsis thaliana* a montré que l'embryon mature est vert, cette couleur étant causée par la non dégradation de la chlorophylle. Les autres particularités observées chez ce mutant concernent des cotylédons ne présentant pas de trichomes comme ceux des mutants *fus3* et *lec2*, mais une intolérance à la dessiccation et une diminution de respectivement 30 % et 60 % de la quantité de protéines et d'huile par rapport au témoin non transformé (Finkelstein et Somerville, 1990 ; Meinke *et al.*, 1994 ; Parcy *et al.*, 1994). La surexpression de *ABI3* chez *Arabidopsis thaliana* s'est traduite par une augmentation du niveau d'expression des mêmes gènes que ceux induits par l'expression de *FUS3* et codant pour des protéines de stockage et des enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides gras (Parcy *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 2007 ; Yamamoto *et al.*, 2010 ; Baud et Lepiniec, 2010). Il semble que *FUS3* active l'expression de *ABI3* et que ces deux gènes soient autorégulés et induits par l'expression de *LEC1* et de *LEC2* (Parcy *et al.*, 1994 ; To *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007 ; Weselake *et al.*, 2009 ; Baud et Lepiniec, 2010).

### 3.1.1.6. Les autres gènes régulant le développement des graines.

Les gènes *FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE)*, *PHERES1 (PHE)*, *MINISEED3 (MINI3)*, *HAIKU2 (IKU2)* régulant le développement des graines chez *Arabidopsis thaliana* peuvent affecter la taille des graines et la teneur en huile dans les graines. En effet, l'étude des mutants *fie*, *phe*, *mini3*, *iku2* a montré une teneur en huile, protéines et amidon dans les graines, pour ces différents mutants, plus faible que celle observée dans la plante non transformée. La surexpression de ces gènes n'a engendré aucune modification du poids et de la taille de la graine ni de la teneur des composés de réserves (huile, protéines, amidon). Seule, la surexpression de *IKU2* engendre une augmentation de 35 % de la teneur en huile dans les graines (Fatihi *et al.*, 2013). La compréhension et l'étude de ces facteurs de transcription pourraient permettre de développer de nouvelles stratégies pour augmenter les teneurs en huile dans les graines.

### 3.1.1.7. Evolution de l'expression des facteurs de transcription dans les graines de lin.

L'analyse de l'expression des ESTs dans les graines de lin n'a pas permis de trouver d'ESTs codant pour *LEC1*, mais son homologue *LEC1-l* a été identifié (Venglat *et al.*, 2011 ; **Figure 28**).



**Figure 28 : Nombre d'ESTs codant pour des facteurs putatifs de transcription connus comme des régulateurs d'embryogenèse (Venglat *et al.*, 2011).**

L'expression des facteurs de transcription *LEC1-L*, *FUS3*, *AGL15* est importante et spécifique de l'embryon aux stades précoces de l'embryogenèse (stade globulaire). Le niveau d'expression tend à diminuer jusqu'à être très faible durant la maturation des graines de lin. Dans ce travail, une expression différentielle de *LEC1-1* entre embryon et téguments a pu être observée. Dans le tégument, cette expression est majoritaire et intervient spécifiquement au stade torpille. Dans l'embryon, l'albumen et les téguments, l'abondance des ESTs *LEC1-1* est plus importante que celle des ESTs de *ABIE3*, *AGL15* et *FUS3* (**Figure 28**).

### **3.1.2. Le rôle d'autres facteurs de transcription dans l'accumulation des huiles de graines oléagineuses.**

L'utilisation de la technologie « RNA seq » a permis d'identifier 87 facteurs de transcription ayant un niveau d'expression très élevé dans les graines de soja et candidats potentiels pour la régulation de la synthèse des lipides (Song *et al.*, 2013). Parmi ces facteurs de transcription, les auteurs ont étudié plus particulièrement *GmbZIP123* qui présente un domaine « leucine zipper ». L'analyse de l'expression de ce gène de soja dans *Arabidopsis thaliana* a engendré une augmentation de la teneur en lipide dans les graines (9 à 10 %), mais également de celles en saccharose, glucose et fructose par rapport à la plante non transformée. L'étude de l'expression de *GmbZIP 123* a mis en évidence une augmentation de l'expression de transporteurs de sucres dans les graines (*SUC1* et *SUC5*) ainsi que de gènes codant pour des invertases (*cwINV1*, *cwINV3*, *cwINV6*). Les transporteurs de sucres sont responsables de l'importation de saccharose dans les graines et notamment dans l'embryon et l'albumen. Dans les graines du mutant *suc5* d'*Arabidopsis thaliana*, une diminution de la teneur en huile de 2 à 13 % a été observée indiquant que le flux de carbone provenant des sucres a été bloqué par ce transporteur (Baud *et al.*, 2005). L'étude de ce transporteur a également révélé sa capacité à transporter la biotine. La biotine est nécessaire à l'activité de nombreuses enzymes clés de la voie de biosynthèse des acides gras comme l'acétyl-CoA carboxylase ou la pyruvate carboxylase une enzyme clé de la glycolyse (Baud *et al.*, 2005). Les invertases permettent la conversion de saccharose en hexose. Une réduction très importante de la taille et du poids de la graine a été observée chez le mutant d'invertase (*cwinv2*) dans le maïs. Les résultats ont montré une accumulation de saccharose et une teneur diminuée en composés de réserves. Une disponibilité réduite des hexoses à partir de

saccharose pour la synthèse des composés de réserves pourrait être à l'origine de ce phénomène (Cheng *et al.*, 1996).

Deux facteurs de transcription Dof (*GmDof1* et *GmDof2*) identifiés dans les graines de soja semblent participer directement à l'augmentation de la teneur en huile des graines (Wang *et al.*, 2007). En effet, l'expression de ces deux facteurs de transcription dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* a permis d'augmenter l'expression de gènes codant pour la sous unité  $\beta$  de l'ACCase et de ceux codant pour la longue chaîne d'acyl-CoA synthétase, induisant une augmentation de la teneur en huile de 11 à 24 % (Wang *et al.*, 2007). Ces plantes transgéniques ont également présenté une augmentation de la taille et du poids de leurs graines. Dans ces graines transgéniques, une baisse de la teneur en protéines a pu être mise en évidence (Wang *et al.*, 2007).

Liu et collaborateurs en 2013, ont montré que, la surexpression de l'orthologue de *MYB73*, permettait d'augmenter la teneur en huile entre 6 et 18 % dans les graines et les feuilles de plantes transgéniques d'*Arabidopsis*, de lotus (*Nelumbo nucifera*) et dans des racines transgéniques (hairy roots) de soja. Les auteurs font l'hypothèse que le *GmMYB73* pourrait induire l'expression de *GL3/EGL3* et empêcher l'expression de *GL2*. La suppression de *GL2* entraîne l'activation de *PLD- $\alpha$ 1*. Or la *PLD- $\alpha$ 1* code pour une phospholipase D qui permet de libérer des acyls-CoA de la phosphatidylcholine et qui peuvent être réintégrés dans des DAGs puis dans des TAGs (Baud et Lepiniec, 2010 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014). La libération d'acyls-CoA et leur intégration dans les DAGs puis les TAGs pourraient expliquer la différence de teneur en huile.

### **3.2. Contrôle physiologique de l'accumulation des huiles.**

Les teneurs en huile dans les embryons de graines oléagineuses sont également régulées par des facteurs physiologiques (Baud et Lepiniec, 2010). Au-delà de la connaissance de ces facteurs comme régulateurs de la teneur en huile, ces facteurs peuvent engendrer des expressions de gènes ou moduler l'activité de protéines du métabolisme carboné. La connaissance des facteurs physiologiques peut permettre de cibler les gènes ou les protéines régulant les teneurs en huile dans les embryons de graines oléagineuses (Baud et Lepiniec, 2010).

### 3.2.1. Co-facteurs nécessaires à la synthèse des acides gras.

La synthèse des composés de réserves dans les graines nécessite de l'ATP (énergie), NADPH/NADP (pouvoir réducteur) et du pyrophosphate (Schwender, 2008 ; Bates *et al.*, 2013). L'ATP est requis pour la carboxylation de l'acétyl-CoA et sa conversion en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase alors que deux réductases du complexe acide gras synthétase, la 3-kétoacyl-ACP réductase et l'énoyl-ACP réductase nécessitent respectivement du NADPH et du NADH pour réduire le groupe cétone du carbone 3 de la chaîne d'acides gras en hydroxyle (3-kétoacyl-ACP réductase) et pour réduire la double liaison entre les atomes de carbone 2 et 3 de la chaîne d'acide gras (énoyl-ACP réductase).

L'ATP est produit par des réactions de la glycolyse cytosolique et plastidiale telles que la phosphoglycérate kinase et la pyruvate kinase. L'analyse d'un mutant de la pyruvate kinase plastidiale hétéromérique, *pkp2-2*, a montré une diminution de la teneur en huile de 3,5 fois dans les graines d'*Arabidopsis thaliana*, alors que chez le double mutant de deux isoformes de la pyruvate kinase plastidiale (*pkpβ1pkpα* ; At5g52920 et At3g22960), une diminution de la teneur en huile de 25 % dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* a pu être enregistrée (Lonien et Schwender, 2009). Cette diminution de la teneur en huile peut être due non seulement à la diminution de la conversion de pyruvate plastidiale en acétyl-CoA plastidial, précurseur de la synthèse des acides gras, mais également à la diminution de la quantité d'ATP disponible pour la synthèse des acides gras (Baud *et al.*, 2007a,b ; André *et al.*, 2007).

Le NADPH est produit par deux enzymes de la voie oxydative des pentoses phosphates, la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la gluconate-6-phosphate déshydrogénase, l'enzyme malique qui permet la conversion du malate en pyruvate et la réaction de la phase claire de la photosynthèse. L'analyse des flux métaboliques dans les embryons photosynthétiques tels que ceux de colza (Schwender *et al.*, 2006) et de soja (Allen *et al.*, 2009) a montré que le NADPH produit par la voie oxydative des pentoses phosphates est plus faible que la demande requise pour la biosynthèse des composés de réserves, contrairement aux embryons non photosynthétiques où la majorité du NADPH est produit par la voie oxydative des pentoses phosphates (Alonso *et al.*, 2010 ; O'Grady *et al.*, 2012). Dans les embryons photosynthétiques, l'apport majoritaire du NADPH pour la synthèse des acides gras est supposé s'effectuer par la réaction dépendante de la lumière de la photosynthèse (O'Grady *et al.*, 2012).

L'ATP nécessaire à la synthèse des acides gras peut également être hydrolysé pour produire du pyrophosphate par la pyrophosphatase. L'analyse du mutant *lo15571* pour une pyrophosphatase cytosolique d'*Arabidopsis thaliana* a montré qu'une augmentation de la quantité de la pyrophosphatase cytosolique dans les graines induit une diminution de la teneur en huile de 5 % et une augmentation des teneurs en amidon (0,038 %), en sucres solubles (1 %), et plus particulièrement en glucose (0,43 %), fructose (0,30 %) et saccharose (0,15 %) dans les graines de ce mutant (Meyer *et al.*, 2012). Les graines de ce mutant présentent également une teneur plus élevée de ces sucres au cours de la synthèse des lipides. Ce résultat témoigne également que la faible conversion du saccharose, glucose et fructose (précurseurs des acides gras) est influencée par l'expression de pyrophosphatase au niveau de la glycolyse cytosolique (Meyer *et al.*, 2012).

### **3.2.2. L'oxygène, un facteur limitant.**

Les graines ont une faible perméabilité aux gaz. Dans les graines de *Brassica napus* cultivées en présence d'oxygène (21%) et à la lumière, la teneur en oxygène est de 17 % dans les siliques et seulement de 0,8 % dans les graines (Vigeolas *et al.*, 2003). L'oxygène joue un rôle central entre l'accumulation de l'amidon et celle des acides gras. En effet, l'amidon est présent dans les régions de l'albumen pauvre en oxygène alors que les triglycérides sont accumulés dans les régions périphériques très riches en oxygène (Eastmond *et al.*, 2000 ; Rolletschek *et al.*, 2004). La surexpression d'un gène (*AHb2*) codant pour une hémoglobine-2 dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* a stimulé l'oxygénation des graines d'*Arabidopsis thaliana* engendrant une augmentation de la teneur en huile de 40 % par rapport aux plantes non transformées (Vigeolas *et al.*, 2011). Cette étude a montré que l'augmentation de la teneur en huile était due à une augmentation du ratio ATP/ADP de 5 fois et à la conversion de 2 fois plus de saccharose en acides gras (Vigeolas *et al.*, 2011). Inversement, dans les graines de plantes cultivées en présence d'une teneur en oxygène réduite, le ratio ATP/ADP diminue engendrant une disponibilité de cofacteurs plus faible pour les réactions de synthèse des acides gras (Vigeolas *et al.*, 2003 ; Baud *et al.*, 2007a ; Vigeolas *et al.*, 2011 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014).

### **3.2.3. Effet de la lumière sur la teneur en huile.**

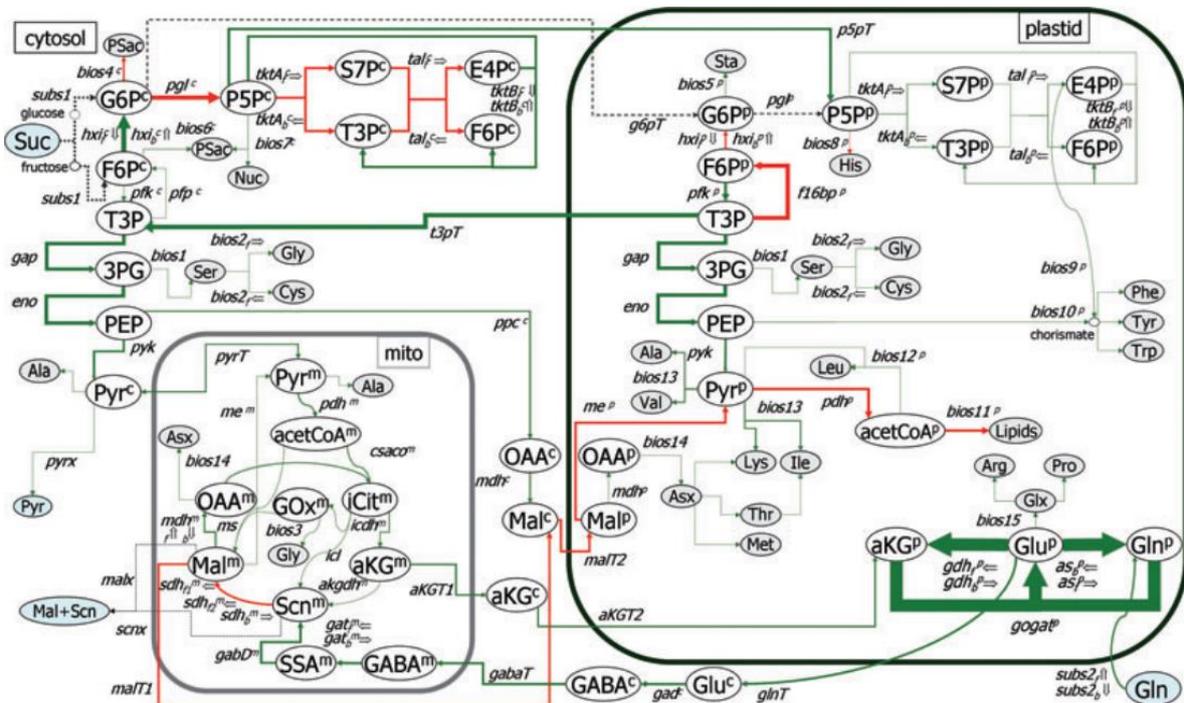
Une teneur en huile de 23 % plus élevée et une teneur en saccharose plus faible (4 à 6 %) ont été observées dans des embryons de colza cultivés en présence de lumière par rapport à celles trouvées dans des embryons de colza cultivés à l'obscurité (Ruuska *et al.*, 2004). En présence de lumière, la conversion de saccharose en triglycéride est deux fois plus efficace que celle observée dans des embryons de colza cultivés à l'obscurité (Ruuska *et al.*, 2004 ; Goffman *et al.*, 2005). Les auteurs expliquent que cette meilleure efficacité de conversion de sucre en acides gras est due à l'activation de la ribulose 1,5 bisphosphate. La ribulose 1,5 bisphosphate permet non seulement la fixation de CO<sub>2</sub> mais également la production d'oxygène. La fixation de CO<sub>2</sub> permet de compenser les pertes de CO<sub>2</sub> dans des réactions telles que celles de la pyruvate déshydrogénase (Schwender *et al.*, 2004) alors que la production d'oxygène permet d'augmenter le rapport ATP/ADP. Or, les enzymes de la voie de biosynthèse des acides gras et du catabolisme des sucres nécessitent ces cofacteurs pour convertir leurs substrats en produits. Les auteurs émettent l'hypothèse que la lumière permet de réguler positivement l'activité de la ribulose 1,5 bisphosphate permettant ainsi d'augmenter les teneurs en oxygène, la production de cofacteurs de réactions du métabolisme carboné et de diminuer les pertes de carbones (CO<sub>2</sub>) et assurant une meilleure conversion du saccharose en acides gras. Ces résultats montrent donc que dans les embryons de colza, la ribulose 1,5 bisphosphate semble être une enzyme clé permettant de réguler les teneurs en huiles dans les embryons (Ruuska *et al.*, 2004 ; Borisjuk *et al.*, 2005 ; Baud et Lepiniec, 2010 ; Sidorov et Tsydendambaev, 2014).

### **3.2.4. Effet de la température sur la teneur en huile.**

La température est un facteur important qui influe sur l'accumulation de l'huile dans les graines (Baud et Lepiniec, 2010). En effet, une étude effectuée sur les embryons de soja a montré que l'accumulation de la teneur en huile pouvait augmenter de 55 % dans des embryons cultivés à 35°C le jour et à 27 °C la nuit par rapport à une culture d'embryons de réalisée à 27 °C le jour et à 20 °C la nuit.

L'analyse comparative des flux métaboliques dans ces embryons de soja (**Figure 29**) a montré que le flux de carbone à travers les réactions anapérotyques catalysées par l'enzyme malique plastidique (MEP), la phosphoénolpyruvate carboxylase cytosolique (PEP-carboxylase) et la malate déshydrogénase (MDH) ainsi que les transporteurs du cytosol vers

la mitochondrie varie considérablement avec la température. Ces réactions ont une influence directe sur la répartition du carbone dans le pool de pyruvate plastidial pour la synthèse des acides gras (Iyer *et al.*, 2008).



**Figure 29 : Carte comparative des flux métaboliques représentant le métabolisme du carbone central dans les cotylédons de soja cultivés à deux températures différentes d'après Iyer *et al.*, 2008.**

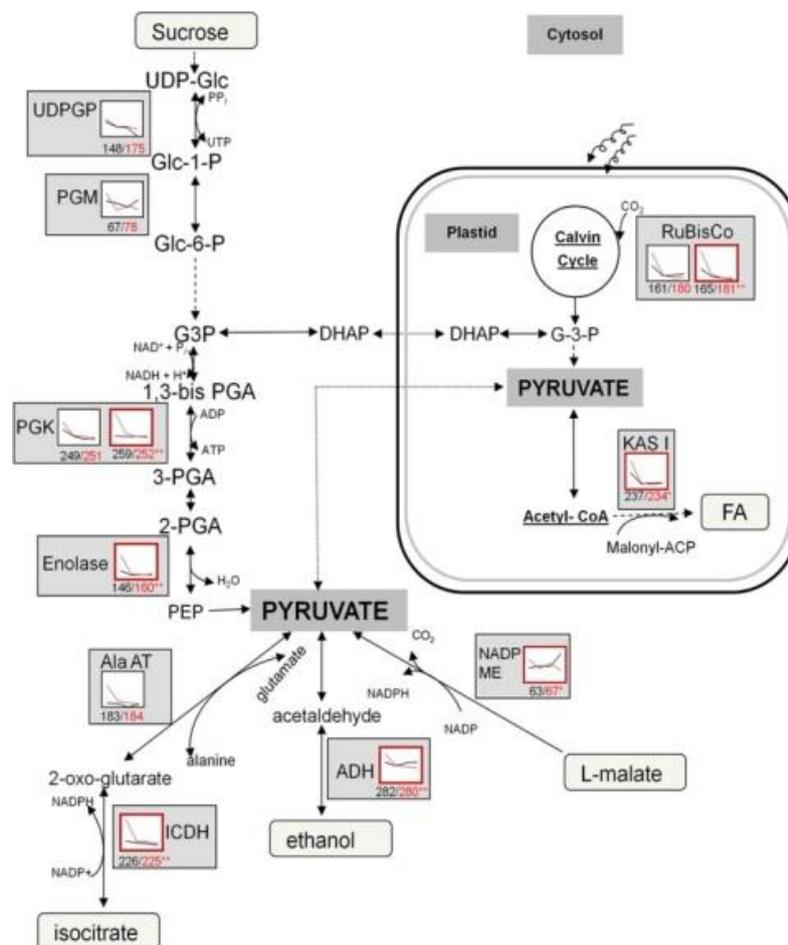
L'épaisseur des flèches est proportionnelle à la différence entre les flux relatifs (normalisés par rapport à 100 moles d'absorption de saccharose) entre la lignée MH et état MM ; MH : embryons cultivés à 35°C jour et 27°C nuit avec une photopériode de 24h sous une luminosité de 500  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  pendant 10 jours ; MM : embryons cultivés à 27°C jour et 20°C nuit avec une photopériode de 24h sous une luminosité de 500  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  pendant 10 jours ; Les flèches rouges et vertes indiquent respectivement que le flux est supérieur ou inférieur à la MM. Une ligne en pointillés gris foncé indique que le flux n'est pas statistiquement différent les uns par rapport aux autres. Abréviations : T3P : triose-phosphate-3 ; oxPPP : voie oxydative des pentoses phosphates ; MALT1 : transporteur malate de cytosol de la mitochondrie ; pfk : phosphofructokinase.

Les données obtenues ont également montré que le flux à travers la voie oxydative des pentoses phosphates augmente de 56 % avec la température, indiquant que cette voie pourrait avoir une implication dans la synthèse des acides gras en produisant le NADPH nécessaire à leur synthèse (Iyer *et al.*, 2008).

### 3.2.5. Effet de la radioactivité sur la teneur en huile.

Tchernobyl est une ville d'Ukraine connue de tous pour la catastrophe liée à l'explosion de la centrale nucléaire le 26 avril 1986. Plus de 20 ans après la catastrophe, une étude effectuée par Klubicová *et al.* (2013) sur des plantes de lin cultivées dans ces terrains

contaminés par du  $^{137}\text{Cs}$  ( $20\,650 \pm 1050 \text{ Bq.kg}^{-1}$ ) et du  $^{90}\text{Sr}$  ( $5180 \pm 550 \text{ Bq.kg}^{-1}$ ) à 5 km de la centrale a permis d'étudier l'effet d'un tel stress sur l'accumulation de la teneur en huile dans les graines de lin. Les plantes cultivées ainsi ont produit 12 % d'huile en plus dans leurs graines par rapport à des graines de plantes cultivées sur un terrain non contaminé. Les analyses protéomiques ont montré une abondance plus importante de protéines liées à la biosynthèse du pyruvate (précurseur de la synthèse des acides gras) par la glycolyse cytosolique (la pyruvate kinase, la phosphoglycérate kinase PGK, l'énolase), la malate déshydrogénase, la déshydrogénation de l'isocitrate et l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde dans les premiers stades de développement de la graine (**Figure 30**).



**Figure 30 : Voies métaboliques liées à la biosynthèse des acides gras dans les embryons de lin d'après Klubicová et al., 2013.**

Les graphiques montrent les volumes relatifs de spots de protéines au cours du développement. Les flèches pointillées sont utilisées en l'absence de la protéine à détecter. Les profils d'abondance surlignés indiquent une différence statistiquement significative entre les champs radio-contaminés et non radioactifs. \* Est utilisé lorsque  $p \leq 0,05$  et \*\* est utilisé lorsque  $p \leq 0,01$ .

Abréviations : ACP : acyl carrier protein ; ADP : adénosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; 1,3 bis PGA : acide 1,3 bis phosphoglycérique ; 2-PGA : acide 2 phosphoglycérique ; 3-PGA : acide 3 phosphoglycérique ; DHAP : dihydroxyacétone phosphate ; G-3-P : glycéraldéhyde 3-phosphate ; Glc-1-P : glucose 1 phosphate ; Glc-6-P : glucose 6 phosphate ; PEP : phosphoénolpyruvate ; UDP-Glc : UDP-glucose ; FA : acide gras ; NADP : nicotinamide adénine dinucléotide réduit ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide oxydé ; UTP : uridine triphosphate ; UDP : uridine diphosphate ;

Les auteurs émettent l'hypothèse que l'abondance plus importante de ces protéines permet un apport plus important de précurseurs carbonés (le pyruvate) nécessaires à la synthèse des acides gras. Ce résultat pourrait également montrer que le flux de carbone permettant la synthèse des acides gras passe par la glycolyse cytosolique jusqu'au phosphoénolpyruvate (PEP<sub>cytosolique</sub>) qui est alors converti en acide oxaloacétique par la PEPc. L'acide oxaloacétique est converti en malate par la malate déshydrogénase (MDH). Le malate est ensuite transporté vers le plaste pour être converti en acétyl-CoA, précurseur de la synthèse des acides gras (Plaxton et Podesta, 2006). Les analyses protéomiques comparatives, effectuées à 2, 4, 6 semaines après floraison et à maturité sur des graines collectées de plantes cultivées soit sur terrain contaminés ou non contaminés, ont permis d'identifier les protéines impliquées dans l'augmentation de la teneur en huile et observées dans les plantes polluées. Les données indiquent une augmentation statistiquement significative de l'abondance de la grande sous-unité de la ribulose 1,5 bisphosphate, une enzyme clé de la photosynthèse, dans les premiers stades de développement de la graine de lin et dans les graines dont les plantes ont poussé dans des terrains contaminés de Tchernobyl.

Les auteurs suggèrent une activité accrue de la photosynthèse au cours du développement de la graine de lin dans un environnement radio-contaminé, permettant un apport carboné et de NADPH plus conséquent pour la synthèse des acides gras. Ces données pourraient suggérer l'importance de la ribulose 1,5 bisphosphate contribuant aux flux de carbones pour la synthèse des acides gras. L'augmentation significative de l'abondance de la ketoacyl-[protéine acylporteur] synthase I liée à la condensation de malonyl-ACP avec l'élongation des chaînes d'acides gras pourrait également permettre une synthèse plus importante d'acides gras.

## **OBJECTIFS DE RECHERCHE**

Afin de mieux comprendre les mécanismes de synthèse, d'accumulation et de régulation de la teneur en huile dans les graines de lin (*Linum usitatissimum*), deux lignées de lin ayant des teneurs en huiles différentes ont été sélectionnées.

Le travail de thèse va porter principalement sur :

- la caractérisation des lignées sélectionnées par l'étude des différences phénotypiques et biochimiques des graines des deux lignées de lin (chapitre 1). Ces données nous ont permis de définir les différences d'accumulation entre les deux lignées de lin et d'émettre des hypothèses expliquant ces différences d'accumulation. Ce travail a été effectué séparément sur les embryons et les téguments de manière à mieux cibler les lieux de modifications et limiter les interactions.

- l'analyse transcriptomique des embryons en développement des lignées sélectionnées (chapitre 2). Cette étude va nous permettre de mettre en évidence des différences d'expression de gènes entre les deux lignées de lin. Cette étude réalisée à différents stades de développement sur les téguments et les embryons servira à identifier des gènes candidats qui pourraient être impliqués dans l'accumulation différentielle des huiles dans les deux lignées sélectionnées.

- l'analyse des flux métaboliques dans les embryons des deux lignées de lin (chapitre 3). Cette analyse aura pour objectif de comprendre comment sont organisées les synthèses dans les embryons de lin, d'identifier les flux majoritaires impliqués dans la synthèse des acides gras (précurseurs nécessaires, ...), de comprendre les réseaux métaboliques conduisant à une optimisation de la synthèse de ces acides gras et lipides afin de définir les points clés conduisant à l'accumulation des huiles dans les graines de lin.

## MATERIELS ET METHODES

### 1. Matériel végétal.

#### 1.1. Lignées de lin sélectionnées.

Les deux lignées de lin utilisées dans ce travail ont été fournies par le sélectionneur de lin Laboulet. Une lignée recombinante (238), issue du croisement entre les deux variétés de lin oléagineux L 91 et L 52.59 ainsi que la lignée *Astral* ont été sélectionnées au laboratoire pour leurs teneurs en huile et la couleur différente de leurs graines (**Figure 31**).

	<i>Astral</i> 	238 
<b>Huile</b> (g/100g MS)***	<b>44,6 +/- 0,2</b>	<b>37,0 +/- 0,7</b>
% d'acides gras (NS)		
C16:0	5,5 +/- 0,2	4,9 +/- 0,7
C18:0	3,5 +/- 0,4	4,3 +/- 0,2
C18:1	15,9 +/- 0,3	15,0 +/- 1,5
C18:2	12,2 +/- 1,4	14,6 +/- 0,9
C18:3	62,9 +/- 0,2	61,2 +/- 2,2

**Figure 31 : Teneur en huile et profil en acides gras des deux lignées de lin sélectionnées.**

p>0.05 = NS ; p<0.001 : \*\*\*

La lignée parental *Astral* présente une teneur en huile significativement ( $p<0.001$ ) plus élevée ( $44,6 \pm 0,2$  g/100g MS) que la lignée 238 ( $37,0 \pm 0,7$  g/100g MS). Par contre, les profils en acides gras d'*Astral* (jaune) et de la lignée 238 (marron) sont significativement similaires.

#### 1.2. Conditions de culture en serre.

Les cultures des plantes de lin ont été effectuées en serre de confinement S2 en présence d'un taux d'humidité de 60 %, une photopériode de 16 h de jour ( $400 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et 8 h de nuit, à température de 20 °C jour et 16°C nuit. Dès le début de floraison, les fleurs sont étiquetées journallement afin de connaître le jour du début de la

fécondation. Les graines sont alors récoltées au stade de développement 16 JAF (Jours Après Floraison), 24, 32, 38 et 50 JAF (graines matures). Les graines sont soit immédiatement congelées à l'azote liquide avant d'être stockées à -80 °C ou décortiquées afin de séparer la fraction embryon de celle du tégument. Chaque fraction est congelée à l'azote liquide avant d'être stockée à -80 °C.

## **2. Méthodes.**

### **2.1. Caractérisation phénotypique du matériel végétal.**

#### 2.1.1. Critères physiologiques des différentes lignées.

Afin de caractériser les lignées de lin sélectionnées, les critères phénotypiques suivants ont été utilisés :

- La taille moyenne des plantes: une mesure de la taille allant de l'interface tige/racine (collet) à l'apex apical de la tige c'est-à-dire jusqu'aux capsules. La mesure a été effectuée pour chaque lignée sur 100 plantes provenant de 5 plantations cultivées entre le 15 octobre 2011 et le 30 janvier 2014. Une plantation comprend 6 pots contenant chacune 4 plantes.
- La date moyenne de début de floraison des différentes lignées a été déterminée par observation visuelle. La date à laquelle les 1<sup>er</sup> fleurs apparaissent, a été retranchée à la date où les graines ont été placées en pots. La date moyenne de début de floraison a été déterminée pour chaque lignée sur 100 plantes provenant de 5 plantations cultivées entre le 15 octobre 2011 et le 30 janvier 2014.
- La durée moyenne de floraison de chaque lignée a été déterminée par observation visuelle. La date à laquelle les dernières fleurs apparaissent, a été retranchée à la date où les 1<sup>er</sup> fleurs apparaissent. La durée moyenne de floraison a été déterminée pour chaque lignée sur 100 plantes provenant de 5 plantations cultivées entre le 15 octobre 2011 et le 30 janvier 2014.
- Le nombre de fleurs par plante pour chaque lignée a été quantifié par observation visuelle. Chaque fleur a été étiquetée et comptée sur chaque plante. Le nombre de fleurs par plante a été déterminé pour chaque lignée sur 100 plantes provenant de 5 plantations cultivées entre le 15 octobre 2011 et le 30 janvier 2014.

### 2.1.2. Caractérisation phénotypique des graines des différentes lignées.

Les critères pris en compte pour caractériser phénotypiquement les graines des différentes lignées sélectionnées sont les suivants :

- La couleur de la graine a été déterminée par une appréciation visuelle de l'expérimentateur.
- La taille moyenne des graines (longueur et largeur) a été mesurée, pour 100 graines matures provenant de 5 plantations, en prenant des photographies sous loupe binoculaire via le logiciel *Motic IMAGE*®. L'analyse et la détermination de la taille moyenne s'effectuent en utilisant le logiciel *Image J*®.
- Le poids moyen des graines a été quantifié en pesant 100 graines matures provenant de 5 plantations en utilisant une balance de précision au millième de milligramme près, après avoir séché à l'étuve les graines pendant 24h. Une plantation comprend 6 pots contenant chacune 4 plantes.

## 2.2. Caractérisation biochimique des embryons/téguments/graines des lignées de lin sélectionnées.

### 2.2.1. Extraction et quantification des lipides, protéines, amidon.

Le matériel biologique lyophilisé a été pesé pour déterminer le poids de la matière sèche. Les trois composés de réserves principaux, huile, amidon et protéines solubles sont extraits sélectivement et séquentiellement selon un protocole adapté de Koubaa *et al*, 2013. Après extraction des huiles, les protéines puis l'amidon sont extraits successivement. Les extractions de lipides, protéines et amidon sont réalisées à partir de 100 mg de graines/embryons/téguments lyophilisés. 5 répétitions biologiques ont été effectuées.

#### 2.2.1.1. Extraction et quantification des lipides.

100 mg de graines/embryons/téguments sont broyés (Percellys tissue homogenizer) à 4 000 rpm pendant 5 minutes dans 1 mL d'hexane-isopropanol (2:1). Le broyat est centrifugé à 13 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les lipides est récupéré. Afin d'optimiser l'extraction de ces huiles, l'opération est effectuée 3 fois sur le culot. Le surnageant obtenu est alors évaporé sous flux d'azote à 60°C (ThermoVap, Thermo

Scientific). L'huile récupérée est pesée. La teneur en huile est évaluée dans 100 mg de graines/embryons/téguments. Le culot est séché à 60°C sous flux d'azote.

#### 2.2.1.2. Extraction et quantification des protéines.

Sur le culot obtenu suite à l'extraction des lipides, 1 mL de tampon d'extraction des protéines (20mM tris-HCL pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % SDS) est ajouté. Après avoir placé l'échantillon à 42°C pendant 15 minutes sous agitation de 1 400 rpm, le mélange est centrifugé pendant 15 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant contenant les protéines est alors récupéré. Afin d'optimiser l'extraction de ces protéines, l'opération est effectuée 2 fois sur le culot et les surnageants sont regroupés.

La quantification des protéines solubles a été effectuée suivant la méthode décrite par Bradford (1976). 200µL de réactif de Bradford (Sigma, St. Louis, USA) sont ajoutés à 10 µL de surnageant protéique, dilué avec 990 µL d'H<sub>2</sub>O. Les absorbances ont été mesurées à une longueur d'onde de 595 nm et les concentrations déterminées grâce à une gamme étalon réalisée avec de la BSA (Sérum Albumine Bovine). Les résultats sont exprimés en gramme équivalent BSA pour 100 grammes de graines/téguments/embryons lyophilisés de lin.

#### 2.2.1.3. Extraction et quantification de l'amidon.

Après extraction des protéines, le culot est repris dans 600 µL d'une solution α-amylase (acétate de sodium pH 4.8, α-amylase 1 600 U/mL (30/1), (v/v)) selon les recommandations du kit total Starch (Megazyme, Irlande). Les échantillons sont incubés à 100°C pendant 30 minutes, afin de solubiliser et hydrolyser l'amidon en maltodextrines non ramifiées. Après refroidissement à température ambiante, 20 µL d'α-amylglucosidase (200 U/mL) sont ajoutés aux échantillons. Les échantillons sont incubés pendant 30 minutes à 50°C, pour hydrolyser les maltodextrines en (D)-glucose sous l'action de l'α-amylglucosidase. Après centrifugation de 5 minutes à 13000 rpm, 3 mL de réactif GOPOD (glucose oxydase et peroxydase) fourni dans le kit Megazyme sont ajoutés au mélange réactionnel. Ce réactif permet de transformer le D-glucose en D-gluconate par action de la glucose oxydase suivant la réaction :



Le peroxyde d'hydrogène produit par la réaction précédente est quantifié par un dosage colorimétrique après action de la peroxydase du GOPOD qui produit un chromogène quantifiable, le quinonéimine suivant la réaction :



Le quinonéimine est dosé par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 510 nm en utilisant une gamme étalon établie à partir de concentrations croissantes de D-glucose. La teneur en amidon est exprimée en mg équivalent glucose pour 100 grammes de graines/embryons/téguments lyophilisés.

### 2.2.2. Quantification des acides gras.

#### 2.2.2.1. Préparation des esters méthyliques.

Après extraction des huiles et quantification, l'extraction des acides gras est effectuée par trans-estérification des triglycérides pour former des esters méthyliques volatils. Le protocole est inspiré des travaux de Bligh et Dyer (1959). La réaction est réalisée avec 5 mg d'huile auxquels sont rajoutés 100 µL de diéthyl éther. La réaction est catalysée par l'ajout de 5 µL de Tetra Méthyl Ammonium Hydroxyde (TMAH). Le mélange est mis sous agitation pendant 10 minutes à 450 rpm, pour favoriser la réaction de méthylation avant d'y ajouter 50 µL de décane pour arrêter la réaction. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 8 000 rpm pendant 2 minutes. Deux phases sont séparées, une phase inférieure contenant le glycérol et une phase supérieure contenant les esters méthyliques. Cette phase supérieure est prélevée, diluée dans l'heptane et les esters méthyliques sont analysés par GC-MS.

#### 2.2.2.2. Séparation par chromatographie en phase gazeuse et identification des acides gras.

Le dosage des esters méthyliques d'acide gras s'est fait par chromatographie en phase gazeuse de type «GC-MS (EI-QQQ) (Thermo TSQ Quantum)». La colonne utilisée pour la séparation des esters méthyliques d'acide gras est une «BPX 70» (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

Les conditions de séparation en GC sont les suivantes :

- Température initiale du four est fixée à 140 °C.
- Un gradient de température (19 °C.minute<sup>-1</sup>) de 140 °C à 230 °C permet la séparation des molécules. Cette température est maintenue pendant 1,2 minute.

La température d'injection est fixée à 230 °C et le mode d'injection choisi est le «Split» avec un ratio de 100. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium avec une vitesse de flux maintenue à 0,9 mL.minute<sup>-1</sup> et une pression de 3 kPa.

Les paramètres utilisés au niveau du spectromètre de masse sont les suivants :

- la température à l'interface est fixée à 230 °C.
- l'ionisation se fait par impact électronique.

Nous avons utilisé un mode d'analyse en «full scan» avec une gamme de scan entre m/z = 40 et m/z = 350 et un temps de scan de 0,1 s.

Les différents acides gras sont identifiés par le passage des standards d'acides gras (acide palmitique, acide stéarique, acide oléique, acide linoléique, acide linoléique). Chaque acide gras est élué avec un temps de rétention donné. L'identification des temps de rétention va permettre de détecter la présence de tels ou tels acides gras dans les échantillons.

La teneur de chaque acide gras est déterminée après l'analyse par GC-MS en étant exprimée en % et calculée selon cette formule :

$$\text{Teneur en acide gras} = \frac{\text{Aire du pic de l'acide gras}}{\text{Somme des aires de tous les pics}} \times 100$$

### 2.2.3. Extraction et quantification des acides aminés.

#### 2.2.3.1. Extraction des acides aminés.

Après extraction, les protéines sont précipitées par l'ajout de 200 µL d'acide trichloroacétique et une incubation dans la glace pendant 1h30. Le mélange est centrifugé pendant 20 minutes à 13 000 rpm pour récupérer le culot de protéines. Ce dernier est repris dans 200 µL de HCl (6N) et incubé pendant 24h à 110°C pour une hydrolyse totale des protéines. Après 24 h d'incubation, les acides aminés sont neutralisés par l'ajout de 200 µL de NaOH (6N). Une centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 minutes permet d'éliminer le reste de débris. Le surnageant est ensuite congelé et lyophilisé pendant 12 h. Le lyophilisat est repris dans 500 µL d'H<sub>2</sub>O MilliQ, pour être analysé en HPLC-MS/MS.

### 2.2.3.2. Quantification des acides aminés par HPLC-MS/MS.

#### 2.2.3.2.1. Préparation de l'échantillon et de la gamme étalon.

La dérivation des acides aminés (standard et échantillons) est effectuée avec le kit AccQ.Tag (Waters, corp, USA) selon les recommandations du fournisseur. 10 µL de standard ou d'extraits biologiques sont mélangés avec 65 µL de tampon AccQ.Tag et 20 µL de réactif de dérivation préalablement reconstitué. Afin d'avoir des conditions correctes d'analyse, un étalon interne (5µL de glutamine marquée [U-13C<sub>5</sub>], à 1mg/mL) est ajouté aux échantillons. La réaction de dérivation a été effectuée à 55°C pendant 10 minutes. Afin de déterminer les quantités des acides aminés, une gamme d'étalonnage est réalisée avec à partir d'une solution standard (*AMINO ACID STANDARD AAs18* – Sigma, St. Louis, USA) et une concentration allant de 0 à 350 µg.mL<sup>-1</sup>.

#### 2.2.3.2.2. Quantification par HPLC-MS/MS.

Le dosage des acides aminés provenant de l'hydrolyse acide des protéines est effectué par chromatographie en phase liquide haute performance (Agilent 1200) couplée à la spectrométrie de masse (Jet Stream ESI-QQQ Agilent 6538). La séparation s'effectue pendant 12 minutes au contact d'une colonne Zorbax 50 mm\*1.8 mm (Agilent) avec un gradient d'élution d'un débit de 0,35 mL/minute. Le gradient d'élution est réalisé avec une solution A (10 mM formate d'ammonium, 0.2 % acide formique) et une solution B (100 % d'acétonitrile), selon la configuration décrite en **Tableau VI**.

A la sortie de la colonne chromatographique, les molécules éluées sont identifiées par spectrométrie de masse. L'ionisation des molécules est effectuée par une Jet Stream ESI «Electrospray» en mode positive à 300°C.

**Tableau VI : Gradient d'élution utilisé pour séparer les acides aminés.**

Temps (min.)	% solution A	% solution B
0	95	5
1	95	5
8	75	25
10	5	95
12	5	95

La quantification des acides aminés est effectuée par «MRM» suivant les conditions décrites en **Tableau VII**, afin d'avoir une sensibilité importante pour la quantification des acides aminés.

**Tableau VII : Méthode MRM utilisée pour quantifier les acides aminés.**

Acides aminés	Ion parent	Ion fils	Frag (V)	CE (V)
Arginine	345.2	171.1	114	26
Histidine	326.2	171.1	100	14
Glutamine 13C <sub>5</sub>	322.2	171.1	89	18
Méthionine	320.2	171.1	99	18
Glutamate	318.1	171.1	143	18
Glutamine	317.2	171.1	89	18
Aspartate	304.1	171.2	124	18
Asparagine	303.1	171.1	89	18
Thréonine	290.1	171.1	114	18
Proline	286.1	171.1	94	14
Sérine	276.1	171.1	133	18
Alanine	260.1	171.1	103	14
Glycine	246.1	171.1	94	18

La quantification des acides aminés dans les échantillons a été effectuée en utilisant le logiciel Mass Hunter Quantitative Analysis 5.0 (Agilent). Les résultats sont exprimés en µg d'acides aminés pour 100 grammes d'embryons lyophilisés de lin.

#### 2.2.4. Extraction des sucres totaux et quantification.

L'extraction des sucres totaux a été réalisée et adaptée à partir de la méthode développée par Oomah *et al.* (1995). 100 mg de graines de lin sont broyées à l'azote liquide. Le broyat est repris dans 5 mL d'H<sub>2</sub>O. Le mélange est ensuite placé dans un bain marie à 85°C pendant 2 heures en agitant vigoureusement toutes les 5 minutes. Les échantillons biologiques sont ensuite centrifugés à 4 000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant contenant les sucres totaux est récupéré.

La teneur de ces sucres totaux est déterminée par dosage colorimétrique selon la méthode de dosage des phénols sulfurique (Dubois *et al.*, 1956). Après extraction, 500 µL

des sucres totaux extraits sont alors prélevés auxquels sont ajoutés 500 µL de phénol à 5 % et 2 mL d'acide sulfurique à 98 %. Les échantillons sont placés au bain marie à 90 °C pendant 5 minutes, puis à l'obscurité pendant 30 minutes. La concentration en sucres totaux dans les échantillons est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 492 nm. Une gamme étalon de glucose (0 µg/mL à 100 µg/mL) a été utilisée pour la quantification des sucres totaux.

#### 2.2.5. Extraction et quantification des sucres libres par HRLC-MS (ESI-QTOF).

##### 2.2.5.1. Extraction des sucres libres.

L'extraction des sucres libres est effectuée à partir de 100 mg de graines broyées de lin (broyeur homogénéisateur Percellys) à 4 000 rpm pendant 5 minutes dans 1 mL d'éthanol (80 %). 4 mL d'éthanol sont ajoutés à l'extrait homogénéisé et le mélange est ensuite chauffé à 90°C pendant 10 minutes. L'ensemble est centrifugé à 1 600 *g* pendant 10 minutes. Le surnageant contenant les sucres libres est récupéré et une seconde extraction est effectuée sur le culot obtenu. Les surnageants contenant les sucres libres sont chauffés à 80°C pour évaporer l'eau et l'éthanol. Le chauffage est arrêté quand il reste moins de 200 µL. La solution concentrée est ensuite séchée sous vide à 30 °C pendant 2h. L'échantillon est ensuite repris dans 500 µL d'eau MQ et transféré dans les flacons pour une analyse en HRLC-MS.

##### 2.2.5.2. Séparation et quantification des sucres libres par HRLC-MS (ESI-QTOF).

Afin de séparer les sucres libres, une méthode d'analyse a été développée en HRLC-MS (DualESI-QTOF Agilent 6538). La séparation s'effectue pendant 30 minutes au contact d'une colonne Hypersil Gold Hilic 150 mm \* 2,1 mm (Thermo) sous un gradient d'élution d'un débit de 0,5 mL/minute. Le gradient d'élution est réalisé avec une solution A (5 mM acétate d'ammonium) et d'une solution B (100 % d'acétonitrile), selon la configuration suivante :

- 0 - 4 minutes : 3 % solution A et 97 % de solution B.
- 4 - 30 minutes : 20 % de solution A et 80 % de solution B.

A la sortie de la colonne chromatographique, les molécules éluées sont identifiées par spectrométrie de masse. L'ionisation des molécules est effectuée par une Dual ESI

«Electrospray» en mode négative. La température de la source est de 200°C. La valeur du fragmenteur de 140 V et une valeur de Skimmer 65 V. La gamme de masse détectée sur le quadropole-temps de vol (QTOF) est de 50 m/z à 1 050 m/z, avec un scan de 2 spectres par seconde. Les sucres sont identifiés par recherche de la masse exacte et du temps de rétention des standards de glucose, fructose, saccharose. Les différents sucres ont été quantifiés en utilisant un étalon interne (Raffinose à 20 µg/mL) et en utilisant une gamme étalon de saccharose, glucose, fructose allant de 0 ng/ml à 100 ng/mL.

#### 2.2.6. Extraction du mucilage séminal et quantification.

L'extraction du mucilage des graines de lin est réalisée à partir de 100 mg de graines, placés dans un tube contenant 10 mL d'eau distillée (Acket *et al.*, 2011). L'échantillon est placé sous agitation dans un bain marie à 80°C durant 30 minutes. Le surnageant est récupéré. L'extraction est réalisée 6 fois afin d'obtenir un épuisement total du mucilage. Les surnageants sont ensuite regroupés, puis congelés et lyophilisés. Le mucilage lyophilisé est ensuite pesé. La teneur en mucilage des graines de lin est exprimée en mg de mucilage lyophilisé pour 100 mg de graines.

#### 2.2.7. Extraction et quantification de la cellulose.

##### 2.2.7.1. Extraction des parois cellulaires.

L'extraction des parois lignocellulosiques des embryons, téguments et des graines entières de lin a été effectuée selon la méthode décrite par Foster *et al.* (2010).

100 mg de matière sèche sont broyés dans 950 µL d'Hexane-Isopropanol (2:1 v/v) à l'aide d'une bille en céramique (2 à 5 mm de diamètre) dans un broyeur (Precellys, Bertin technology) pendant 5 minutes à 4 000 rpm. Le broyat est centrifugé à 13 000 rpm pendant 3 minutes. Le culot obtenu est repris dans 1,5 mL d'éthanol 70 % et broyé une seconde fois. Après centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes, le culot est repris dans 1,5 mL de chloroforme/méthanol (1:1 v/v) puis agité vigoureusement pour une resuspension totale du culot. Après une centrifugation de 10 minutes à 10 000 rpm, le culot est repris dans 500 µL d'acétone. Le culot est débarrassé du solvant par évaporation de l'acétone sous flux d'azote. Le lavage à l'acétone a été effectué 2 fois.

### 2.2.7.2. Extraction et quantification de la cellulose.

L'extraction et le dosage de la cellulose sont effectués selon la méthode décrite par Foster *et al.* (2010).

Les parois cellulaires obtenues précédemment subissent un premier traitement à l'acide trifluoroacétique (TFA). 250 µL de TFA 2M sont ajoutés à chaque tube, avant une incubation de 90 minutes à 121°C dans un bloc chauffant. Après refroidissement sur glace et centrifugation (10 000 rpm, 10 minutes), le culot est repris dans 1 mL de réactif Updegraff (acide acétique, acide nitrique, eau, 8:1:2 v/v) préparé préalablement, chauffé à 100°C pendant 30 minutes puis centrifugé (10 000 rpm, 15 minutes). Lors de cette hydrolyse, la cellulose cristalline est le seul composé qui n'est pas soluble dans l'Updegraff. Le culot est lavé trois fois avec 1,5 mL d'eau et séché toute une nuit sous flux d'air et à température ambiante sous hotte. Pour une hydrolyse totale de la cellulose cristalline en glucose, 175 µL d'acide sulfurique à 72% sont ajoutés au culot. La réaction a lieu pendant 30 minutes à température ambiante, sous agitation et suivie d'une incubation de 15 minutes. 825 µL d'eau sont ajoutés au mélange.

Après centrifugation, 10 µL du surnageant dilué avec 90 µL d'eau sont ajoutés à 200 µL de réactif anthrone (2 mg anthrone / ml d'acide sulfurique 95%). Les échantillons sont chauffés à 80°C et incubés à l'obscurité pendant 30 minutes. La concentration de la cellulose est déterminée en équivalent glucose par mesure de l'absorbance à 625 nm. La concentration en cellulose est déduite et exprimée en mg d'équivalent glucose par rapport à une droite d'étalonnage faite préalablement avec différentes concentrations de glucose de 0 µg/mL à 500 µg/mL.

### 2.2.8. Extraction et quantification des proanthocyanidines.

L'extraction des proanthocyanidines est effectuée à partir des graines matures de lin selon la méthode utilisée par Zuk *et al.* (2012). Après broyage des graines (15 mg) dans l'azote liquide, 1 mL de n-butanol-HCl (95:5, v/v) et 33 µL de NH<sub>4</sub>Fe(SO<sub>4</sub>) 2·12H<sub>2</sub>O 2% (w/v) dilué dans 2 M HCl sont ajoutés. L'hydrolyse des proanthocyanidines est effectuée durant 40 minutes à 95°C. L'extrait est ensuite centrifugé à 13 500 rpm pendant 10 minutes et le surnageant utilisé pour déterminer les teneurs en proanthocyanidines. La concentration en proanthocyanidines dans les graines de lin est déterminée en équivalent catéchine par

mesure de l'absorbance à 540 nm. La concentration en proanthocyanidine est déduite et exprimée en mg d'équivalent en catéchine pour 100g de graines, grâce à une courbe de calibration faite préalablement avec différentes concentrations de catéchine de 0 µg/ml à 1 000 µg/mL

#### 2.2.9. Extraction et quantification des polyphénols.

L'extraction des polyphénols des graines, téguments et embryons des graines de lin a été effectuée selon une méthode modifiée de Popova *et al.* (2009) et qui repose sur le principe d'une macération hydro-alcoolique suivie d'une hydrolyse acide.

##### 2.2.9.1. Extraction des polyphénols.

Pour l'extraction des polyphénols, 50 mg de matériel végétal (graines entières, téguments et embryons) ont été broyés, déshuilés (2.2.1), puis macérés dans 2 mL de méthanol/eau (80:20 v/v) pendant une heure. Le surnageant récupéré après centrifugation (10 000 rpm, 10 minutes) va subir une hydrolyse acide avec 250 µL d'HCl 6 N pendant 1 heure à 100°C. L'HCl est neutralisé par l'ajout de 250 µL de NaOH 6N. Après une centrifugation de 3 minutes à 15 000 rpm, le surnageant est conservé à - 20 °C pour le dosage des polyphénols.

##### 2.2.9.2. Quantification des polyphénols totaux.

Le dosage des polyphénols totaux est effectué par une méthode adaptée de Singleton et Rossi (Raggae *et al.*, 2006), en utilisant le réactif de Folin Ciocalteu constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Ce mélange est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite a une absorption maximum de 725 nm et est proportionnelle à la teneur en composés phénoliques (Catalano *et al.*, 1999). Ce dosage permet de déterminer la concentration en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée à partir de concentrations connues d'acide férullique de 0 µg/mL à 500 µg/mL.

Pour ce dosage de polyphénols, 200 µl d'extrait végétal aqueux sont ajoutés à 1 000 µL du réactif Folin–Ciocalteu (dilué 10 fois). Après agitation et ajout de 800 µL de carbonate de sodium Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75g/l), le mélange est vortexé puis placé au bain marie pendant 10 minutes à 60°C. L'absorbance est mesurée à 750 nm et la concentration en

polyphénols totaux calculée par extrapolation à partir de la droite d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  d'équivalent acide férullique pour 100 g de matières sèches.

### 2.2.9.3. Séparation, identification et quantification des polyphénols par HRLC-MS.

L'identification et la quantification des polyphénols sont effectuées par une méthode HRLC-MS (ESI-QTOF Agilent 6538) mise au point par Boussetta (2010) et modifiée au sein du laboratoire.

La séparation chromatographique s'effectue par l'intermédiaire d'une colonne d'élution C18 phase inverse (Hypersil Gold, 150 x 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$  Thermofisher, France) à une température constante de 35°C, pendant 55 minutes, sous un gradient d'élution d'un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Le gradient d'élution est réalisé avec une solution A (0,2 % acide acétique) et une solution B (100 % d'acétonitrile) selon la configuration suivante :

**Tableau VIII : Gradient d'élution pour séparer les polyphénol.**

Temps (min.)	% solution A	% solution B
0	6	94
20	18	82
35	28	72
45	60	40
46	90	10
50	90	10
55	6	94

A la sortie de la colonne de chromatographie, les molécules éluées sont identifiées par spectrométrie de masse. L'ionisation des molécules est effectuée par un dual ESI «electrospray» en mode négatif. La température de la source est de 350°C avec un fragmenteur de 120 V et une valeur de skimmer 65 V. La gamme de masse détectée sur le quadrupole-temps de vol (QTOF) est de 50 m/z à 1000 m/z avec un scan de 2 spectres par seconde. Les polyphénols sont identifiés par recherche de la masse exacte ( $M-H^+$ ) à partir d'une base de données développée à l'INRA ([www.phenol-explorer.eu](http://www.phenol-explorer.eu)). Les polyphénols sont aussi caractérisés par leur temps de rétention et la comparaison avec celui obtenu pour des standards (sécoisolarisinal, vanilline, quercétine, catéchine et les acides cinnamique,

férullique, gallique, caféiques, p-coumarique, syringique, sinapique et 3,4-dihydrobenzoïque). Les différents polyphénols sont quantifiés en utilisant des courbes de calibration réalisées avec le sécoisolarisnol, la vanilline, la catéchine ainsi que les acides cinnamique, férullique, gallique, caféiques, p-coumarique, syringique, sinapique et 3,4-dihydrobenzoïque pour des concentrations allant de 0 µg/ml à 150 µg/ml.

#### 2.2.10. Analyse statistique.

Le test de Student et le diagramme en boîte sont utilisés pour effectuer l'analyse statistique des résultats et leur validation. Les analyses statistiques sont effectuées dans un tableau Excel®. Différents seuils de significativités sont déterminés pour l'analyse de Student ( $p > 0,05$  : NS ;  $p < 0,05$  : \* ;  $p < 0,01$  : \*\* ;  $p < 0,001$  : \*\*\*).

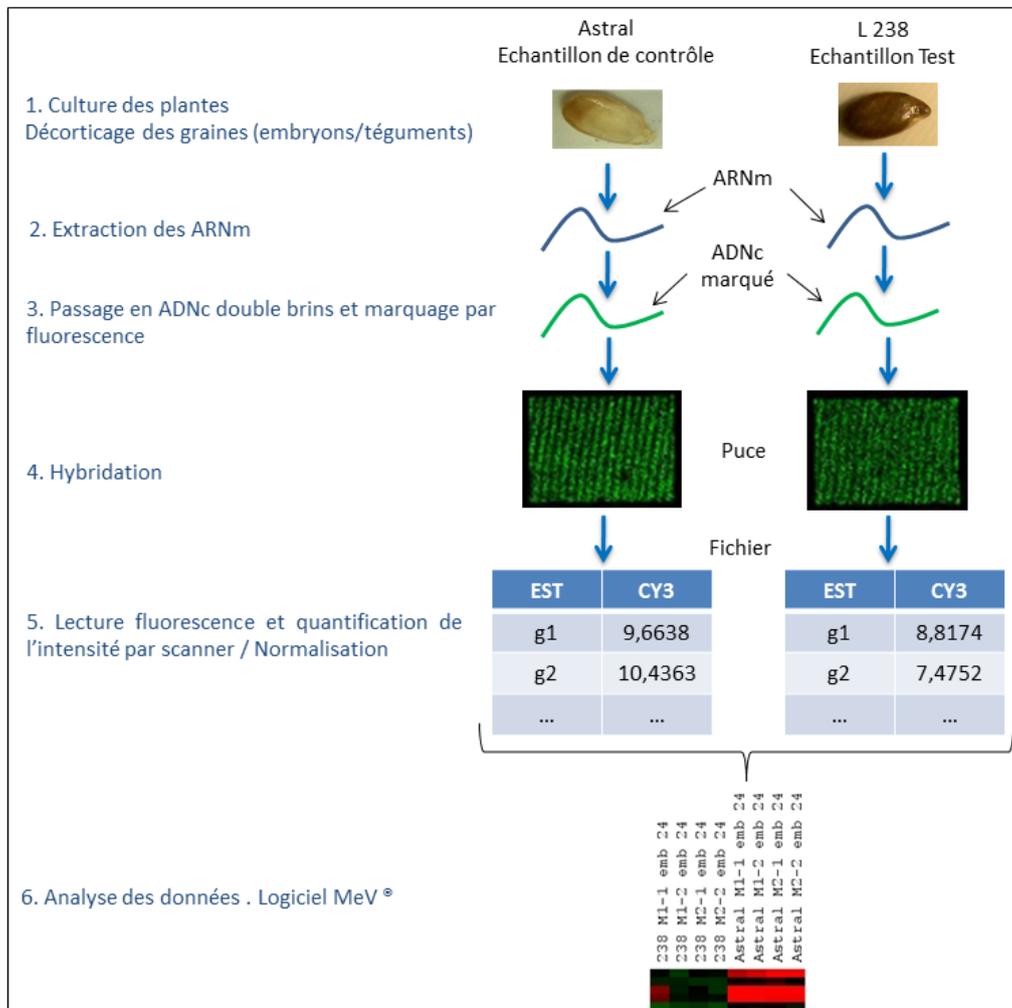
### 2.3. Analyse Transcriptomique.

#### 2.3.1. Principe et méthodologie.

Les puces à ADN ont notamment été développées pour déterminer le niveau d'expression de l'ensemble des gènes par mesure de l'abondance relative de chaque ARNm transcrit dans un tissu donné et à un temps bien déterminé. Cette technologie offre donc une représentation dynamique de l'état de la cellule, du tissu et des processus biologiques au moment de l'analyse (Fenart *et al.*, 2010). L'analyse transcriptomique a été effectuée à partir d'embryons et de téguments des lignées *Astral* et *238* collectés à 4 stades de développement (16 JAF, 24 JAF, 32 JAF, 38 JAF). Pour chaque point de cinétique, 2 répétitions biologiques et 2 répétitions techniques ont été réalisées.

Après culture des plantes et obtention des graines, l'ARNm a été extrait des cellules à partir d'un tissu, d'un stade de développement, à un temps donné (**Figure 32, étape 2**). Ces ARNm sont ensuite transformés en ADNc par la méthode de transcription inverse et marqués à l'aide de fluorochromes (Cy3 ou Cy5) (**Figure 32, étape 3**). Chaque échantillon dont les ADNc ont été marqués, s'hybride aux ADNc complémentaires sur des puces à ADN (**Figure 32, étape 4**). Des puces spécifiques «lin» ont été utilisées pour analyser le transcriptome des lignées *Astral* et *238* productrices de plus ou moins d'huile. Ces puces à ADN de lin fabriqué par la société Roche-Nimblegen comprend (4 copies) des brins monocaténaire d'ADN de 60 mers (60 oligonucléotides de long) pour 46 589 contigs par «puits». Les contigs ont été sélectionnés à partir d'une collection de 59 000 contigs obtenus

par l'assemblage des séquences GS FLX (Fenart *et al.*, 2010 ; Fenart *et al.*, 2013). Ces puces de 60 mers ont été validées et sont beaucoup plus robustes que les puces de types 25 mers (Fenart *et al.*, 2013).



**Figure 32 : Principe et méthodologie des puces à ADN.**

Chaque puce est alors scannée par un laser de manière à obtenir les intensités numériques de chaque ADNc/ESTs correspondant aux intensités lumineuses. L'intensité mesurée pour chaque ADNc/ESTs représente son niveau d'expression relatif. Après normalisation des données, élimination des mesures artéfactuelles et ajustement de l'ensemble des intensités mesurées pour pallier l'effet de marquage, les données obtenues pour deux échantillons sont comparées (**Figure 32, étapes 5 et 6**). Cette comparaison des ADNc/ESTs permet de mettre en évidence les gènes différentiellement exprimés entre les deux échantillons.

### 2.3.2. Extraction des ARN.

100 mg d'embryons ou de téguments de lin sont broyés dans de l'azote liquide puis transférés dans un tube polypropylène contenant 2 mL de tampon TLES (100 mM Tris-HCL pH 8, 100 mM LiCl, 10 mM EDTA pH 8, 5 % SDS) et 200 µL de PEG 8000 (20 %). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 12 000 g pour permettre la précipitation des polyphénols et des polysaccharides. Le surnageant (2 mL) est transféré dans un nouveau tube auquel est ajouté 2 mL de phénol à 80°C. Après avoir vortexé 30 secondes, 2 mL de Chloroforme/Isoamyl Alcool (24/1) sont ajoutés. Les échantillons sont vortexés 20 secondes, puis centrifugés 10 minutes à 12 000 g et à 4°C. Le surnageant obtenu est alors transféré dans un nouveau tube et 1 volume de LiCl 4 M est ajouté. Après avoir placé les échantillons à 4°C pendant 12 heures, ceux ci sont centrifugés 30 minutes à 12 000 g et à 4°C. Le surnageant est éliminé. Le culot est alors dissout dans 125 µL H<sub>2</sub>O auquel 12,5 µL d'acétate de sodium à 3 M (pH 5,2) et 250 µL d'éthanol 100% sont ajoutés. Les échantillons sont placés 1 heure à -80°C, puis centrifugés 20 minutes à 12 000 g et à 4°C. Le culot obtenu est lavé avec de l'éthanol 80 % puis dissout dans 22 µL d'H<sub>2</sub>O. 1 µL est utilisé pour doser la pureté des échantillons en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). Le contrôle de l'intégrité des ARN est effectué par puce ARN Experion (BioRad) en utilisant sur 1 µL d'échantillon.

### 2.3.3. Synthèse des ADNc.

La synthèse des ADNc est réalisée à l'aide du kit «cDNA Synthesis System» (Roche).

2 µL d'oligo dT<sub>15</sub> primer (200 pmol/µl) sont ajoutés à 5 µg ARN extrait précédemment. Après incubation des échantillons à 70 °C pendant 10 minutes, 8 µL du tampon RT (5x), 4µL de DTT (0,1M), 2 µL de reverse transcriptase (25 U/µl), 25 Unités de Protector Rnase inhibitor et 4 µL de dNTP (10 mM) sont ajoutés. Les échantillons sont incubés 60 minutes à 42°C afin de permettre l'hybridation du 1<sup>er</sup> brin de cDNA. Après synthèse du 1<sup>er</sup> brin de cDNA, 30 µL de tampon buffer (5x), 1.5 µL de dNTP (10 mM), 6,5 µL de «second stand enzyme blend» et 72 µL d'H<sub>2</sub>O sont ajoutés aux échantillons. Après avoir incubé les échantillons pendant 2 heures à 16°C, 20 µL de T4 DNA polymerase sont ajoutés. Le mélange est incubé pendant 5 minutes à 16°C et la réaction est arrêtée par ajout de 17 µL d'EDTA (0,2 M pH 8,0). Pour éliminer toute trace d'ARN dans les échantillons, 1.5 µL de RNase I (15 U) est ajouté afin de digérer les ARN restant dans les échantillons. La réaction est

effectuée à 37°C pendant 30 minutes. 5µL de protéinase K (0,25 U) sont ajoutés aux échantillons afin de digérer les RNase I. La réaction est réalisée à 37°C pendant 30 minutes. 200 µL de phénol pH 8,0 sont ajoutés aux échantillons. Après avoir vortexé 10 secondes puis centrifugé 15 secondes à 3 000 rpm les échantillons, le surnageant est récupéré et placé dans un nouveau tube. Le culot phénolique du 1<sup>er</sup> tube est alors lavé avec du tampon TE (50 µL) pour minimiser les pertes d'ADN. Après avoir vortexé et centrifugé 15 secondes, le surnageant est récupéré et ajouté au surnageant précédemment obtenu. 200 µL de phénol/chloroforme/isoamylalcool (25 :24 :1) sont ajoutés aux échantillons. Après avoir vortexé 10 secondes et centrifugé 15 secondes à 3 000 rpm, le surnageant est récupéré et lavé 2 fois avec 200 µL de chloroforme/isoamylalcool. Le surnageant contenant l'ADN est précipité pendant 1 heure à -80°C après ajout de 0,6 volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2 et 2,5 volume d'éthanol 100 %. Les échantillons sont alors centrifugés à 12 000 rpm pendant 10 minutes. Le culot d'ADN est récupéré et lavé avec 300 µL d'éthanol 70 %. Après une centrifugation à 12 000 rpm pendant 5 minutes, le surnageant est éliminé et le culot séché en laissant les échantillons 5 minutes à température ambiante. Le culot d'ADN est alors repris dans 20 µL d'H<sub>2</sub>O. 1 µL est utilisé pour doser la pureté des échantillons par spectrophotométrie Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

#### 2.3.4. Marquage des ADNc au Cy3 et Cy5.

Le marquage des ADNc au Cy3 et Cy5 a été réalisé avec le kit Nimblegen Dual Color DNA labeling kit (Roche). Les échantillons des stades 32 JAF et 38 JAF ont été marqués au Cy3 alors que les échantillons des stades 16 JAF et 24 JAF ont été marqués au Cy5.

Pour cela, 40 µL de Cy3/Cy5 sont ajoutés à 1 µg d'ADNc dilué dans 40 µL d'H<sub>2</sub>O. Après dénaturation des échantillons à 98 °C pendant 10 minutes, ceux ci sont placés dans un bain de glace pendant 2 minutes. 20 µL d'un mélange de dNTP/Klenow (10 mM dNTP, 50 U/µL de fragment Klenow 3'→5' exo) sont ajoutés aux échantillons dénaturés. Les échantillons sont incubés à 37 °C pendant 2 heures pour permettre le marquage. La réaction est alors stoppée par l'ajout de 21,5 µL de solution STOP. 110 µL d'isopropanol sont ajoutés aux échantillons colorés afin de les laver et de précipiter uniquement les ADNc. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante (20°C) et une centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes, le surnageant est éliminé et le culot lavé une seconde fois par ajout de 500 µL d'éthanol 80 %. Les échantillons sont centrifugés pendant 2 minutes à 12 000 g et le

surnageant éliminé. Le culot d'ADNc marqué au Cy3/Cy5 est alors séché pendant 5 minutes, puis repris dans 15  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$ . 1  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon est alors analysé par spectrophotométrie Nanodrop 1000 (Thermo Scientific) afin de connaître le taux de marquage des ADNc et les quantités d'ADNc. Les échantillons sont une nouvelle fois séché par speed vac pendant 5 minutes et le culot sec est alors conservé à  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  afin d'effectuer les hybridations par la suite.

### 2.3.5. Hybridation des échantillons marqués au Cy3 et Cy5.

L'ADNc marqué au Cy3/Cy5 (4 $\mu\text{L}$ ) est dilué avec 3,3  $\mu\text{L}$  de *Sample Tracking Control* (STC). Après centrifugation, l'échantillon est repris dans 8,7  $\mu\text{L}$  de la solution d'hybridation (tampon d'hybridation, composant d'hybridation A, Oligo d'alignement respectivement à 69.41%, 27.76 %, 2.82%). L'échantillon est alors placé dans un bain à sec à  $95^\circ\text{C}$  pendant 5 minutes, protégé de la lumière, puis dans un bain à sec à  $42^\circ\text{C}$ . 6  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont alors déposés sur les puits de la puce d'ADN de lin 12 plex. Après fermeture des ports des 12 «puits», la puce à ADN est placée dans la chambre d'hybridation à  $42^\circ\text{C}$ . Après 20 heures d'hybridation, la puce à ADN est lavé avec du tampon I (225 mL d' $\text{H}_2\text{O}$ , 25 mL tampon I, 25  $\mu\text{L}$  DTT 1M) en agitant 2 minutes. La puce à ADN est lavée une seconde fois dans un tampon II (22.5 mL d' $\text{H}_2\text{O}$ , 2.5 mL tampon II, 2.5  $\mu\text{L}$  DTT 1M) en agitant vigoureusement la lame pendant 1 minute. La puce à ADN est lavée une troisième fois dans un tampon III (22,5 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , 2,5 mL tampon III, 2,5  $\mu\text{L}$  DTT 1M) en agitant la lame pendant 1 minute vigoureusement. Après séchage de la lame par centrifugation, la puce à ADN est scannée à 532 nm.

### 2.3.6. Lecture et traitement de l'image.

Les lames ont été numérisées avec une résolution 5  $\mu\text{m}/\text{pixel}$  en utilisant un scanner Axon GenePix 4000B (Molecular Devices Corporation) piloté par le logiciel GenePix Pro 6.0 (Axon). Les images numérisées (au format TIFF) ont ensuite été importées dans le logiciel NimbleScan (Nimblegen Systems, Inc., Madison) pour l'alignement de la grille et les données d'expression analyses. Les données d'expression ont été normalisées par la normalisation quantile et un algorithme « Robuste Multichip moyenne » (RMA) inclus dans le logiciel NimbleScan (Bolstad *et al.*, 2003 ; Irizarry *et al.*, 2003).

### 2.3.7. Analyse statistique des données de transcriptomique.

L'analyse statistique des données est effectuée à l'aide du logiciel MeV 4.9.0® (Saeed *et al.*, 2003). Une analyse «Significance Analysis for Microarrays» (SAM) (Tusher *et al.*, 2001) a été réalisée pour identifier les gènes différentiellement exprimés dans les différentes conditions testées pour les lignées *Astral* et *238*. Pour les gènes différentiellement exprimés entre les deux conditions, la moyenne des répétitions biologiques et techniques d'un échantillon a été calculée. La moyenne de l'expression des ESTs entre *Astral* et *238* a été retranchée. Seules, les différences entre *Astral* et *238* pour un  $\log_2\text{ratio} \geq 2$  et  $\leq -2$  ont été utilisés pour faire la discrimination entre les profils d'expression. La différence d'expression des ESTs a servi à l'élaboration de cartes d'expression en utilisant le logiciel CellDesigner 4.4® (Funahashi *et al.*, 2003 ; Funahashi *et al.*, 2008).

### 2.3.8. Modélisation des données.

Les réseaux biochimiques ont été rédigés au format SBML (Systems Biology Markup Language) à partir de deux bases de données, KEGG (Kanehisa, 1997) et Pantherdb.org (Thomas *et al.*, 2003). Les données de protéomiques sur les graines de lin (Barvkar *et al.*, 2012 ; Klubicová *et al.*, 2013) et les données de marquages issues des incubations d'embryons avec des substrats marqués effectuées dans le cadre de cette thèse ont aussi été utilisées.

Le réseau métabolique est construit en prenant en compte les réactions du métabolisme carboné incluant les réactions de la glycolyse plastidiale (chloroplaste), la glycolyse cytosolique (cytosol), la voie des pentoses phosphates (chloroplaste), le cycle de Krebs (mitochondrie), les réactions de biosynthèse des composés pariétaux, des triglycérides à partir du glycérol-3-phosphate, la réaction de la synthèse de l'acétyl-CoA chloroplastique, la réaction de la biosynthèse de l'acide glutamique. Un réseau métabolique correspondant aux voies de synthèses des proanthocyanidines a été construit.

La compartimentation cellulaire (mitochondrie, chloroplaste et cytosol) a été prise en compte dans le modèle mathématique conçu. Les métabolites sont représentés sous forme ovale orange (intermédiaires de la glycolyse), ovale jaune (acétyl-CoA plastidial, triglycéride, acides gras), ovale rose (métabolites de la voie des pentoses phosphates), ovale marron (métabolites de cycle de Krebs), ovale bleu (acides aminés) et ovale rouge (métabolites

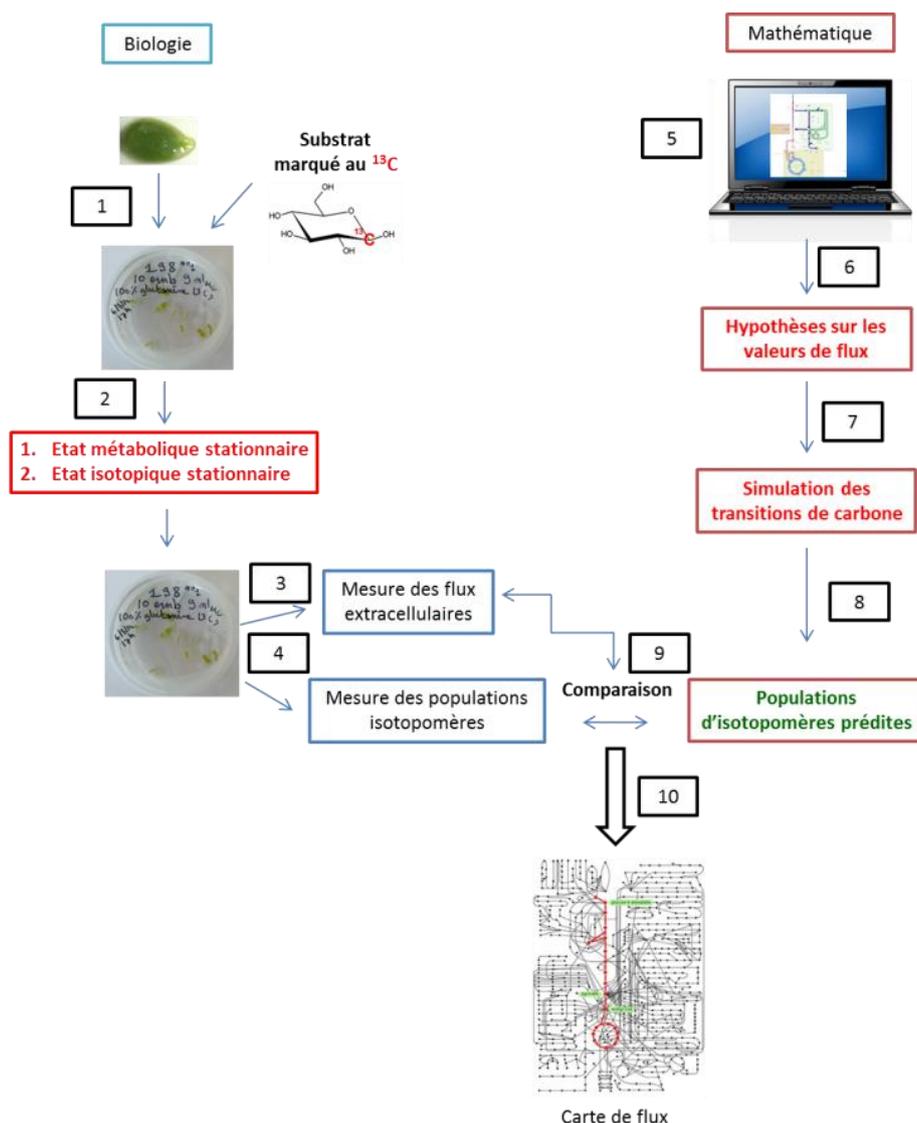
entrant dans les embryons). Les réactions sont représentées par des rectangles en vert clair. Les ESTs différentiellement exprimés apparaissent dans des rectangles avec le préfixe «genolin».

Les rectangles correspondant aux ESTs surexprimés dans les embryons et téguments de 238 par rapport à ceux d'*Astral* sont de couleur verte. Les ESTs surexprimés ( $\text{Log}_2\text{ratio} : [2 ; 2,5[$ ) dans les embryons *Astral* par rapport à 238 sont représentés par des rectangles de couleur jaune. Les ESTs surexprimés ( $\text{Log}_2\text{ratio} : [2,5 ; 3[$ ) dans les embryons et téguments de *Astral* par rapport à 238 sont représentés par des rectangles de couleur jaune-orange. Les ESTs surexprimés ( $\text{Log}_2 \geq 3$ ) dans les embryons *Astral* par rapport à 238 sont représentés par des rectangles de couleur rouge.

## **2.4. Analyse des flux métaboliques au carbone 13.**

### 2.4.1. Principe et méthodologie.

L'analyse des flux métaboliques au carbone 13 est définie comme étant une analyse de l'ensemble des flux métaboliques (flux internes et externes) au sein d'une cellule ou d'un organisme. Cette technique permet la mesure des flux intracellulaires à partir de la mesure des flux extracellulaires et des enrichissements en carbone 13 (Schwender, 2011). La méthodologie consiste (**Figure 33**) à incuber des embryons en présence de substrats marqués au carbone 13 jusqu'à ce que l'état métabolique et l'état isotopique stationnaires soient atteints. Après culture de ces embryons, les flux extracellulaires sont mesurés, les métabolites sont extraits et la mesure des populations d'isotopomères est effectuée. Ces données sont regroupées dans un fichier ftbl comprenant notamment les réactions du réseau métabolique à analyser. Un logiciel de calcul de flux va émettre des hypothèses sur les valeurs de flux à partir des données du réseau métabolique, simuler les transitions de carbones et déterminer les populations d'isotopomères. Ces populations d'isotopomères sont comparées aux mesures des populations d'isotopomères déterminés biologiquement. Un ajustement itératif de la valeur des flux permet l'obtention de la valeur des flux internes.



**Figure 33 : Principe général de l'expérience de marquage isotopique utilisé pour le calcul des flux métaboliques, adapté de Schwender (2011).**

1. Incubation des embryons en début de synthèse des lipides dans un milieu de culture contenant des substrats marqués au carbone 13.
2. Culture des embryons jusqu'à atteindre l'état métabolique stationnaire et l'état isotopique stationnaire.
- 3,4. Récupération du milieu de culture et des embryons. Ces deux fractions seront utilisées pour mesurer/analyser les populations d'isotopomères et les flux extracellulaires.
5. Rédaction du réseau métabolique au format FTBL.
6. Emission d'hypothèses sur les valeurs de flux à partir du réseau.
7. Détermination des transitions carbonées.
8. Prédiction des populations d'isotopomères.
9. Comparaison des populations d'isotopomères prédites et mesurées et ajustement itératif des valeurs de flux.
10. Obtention des valeurs de flux internes.

#### 2.4.2. Cinétique d'accumulation *in-vitro* et *in-planta*.

Après culture des plantes et étiquetage journalier des fleurs (Matériels et Méthodes, 1.2.), les capsules âgées de 16 JAF (Jours Après Floraison) sont récoltées. La stérilisation des capsules et la culture des embryons sont effectuées en suivant la méthode utilisée par

Koubaa *et al.*, (2013) avec des modifications. Les capsules sont stérilisées pendant 20 minutes dans un bain contenant 50 % d'eau de javel. Les capsules sont ensuite rincées pendant 20 minutes dans un bain contenant de l'eau autoclavée. Les capsules stériles sont séchées et disséquées en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. 10 embryons sont placés dans une boîte de Pétri contenant 9 mL de milieu de culture adapté de Schwender *et al.* (2003) et Troufflard *et al.* (2007). Le milieu de culture contient 100 mM de glucose, 800 mg/L de glutamine, 22 % PEG (polyéthylène glycol) 4000, 125 mg/L de KNO<sub>3</sub>, 370 mg/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 350 mg/L de KCl, 125 mg/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mg/L de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 10 mg/L de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,25 mg/L de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0,025 mg/L de CuSO<sub>4</sub>, 0,025mg/L de CoCl<sub>2</sub> et 5mg/L d'acide nicotinique. Le tampon du milieu de culture est ajusté à un pH de 8,8 avec 1 M de KOH. La boîte de Pétri est ensuite placée dans un phytotron à 18°C, sous une intensité lumineuse de 20  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  et une humidité contrôlée de 60 %. 3 boîtes de Pétri, contenant chacune 10 embryons, sont cultivées par point de cinétique. Après, 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation, les embryons sont récupérés, lavés 3 fois avec de l'eau milliQ stérile, puis congelés dans de l'azote liquide et lyophilisés. Le poids des embryons lyophilisés a été déterminé. Les teneurs en huiles, protéines et amidon des embryons incubés sont déterminées selon le protocole décrit au paragraphe 2.2.1. du Matériels et Méthodes. Ces teneurs sont comparées avec les teneurs en huiles, en protéines et en amidon d'embryons de lin âgés de 17 JAF, 19 JAF, 21 JAF, 23 JAF et collectés directement sur des plantes cultivées.

#### 2.4.3. Etat métabolique stationnaire.

##### 2.4.3.1. Culture des embryons.

La méthodologie de culture des embryons pour l'étude de la détermination de l'état métabolique stationnaire est identique à celle mise au point pour la quantification des composés de réserves en cours du développement des embryons (& précédent "cinétique d'accumulation").

Dans ce cas, 5 des 10 embryons cultivés par point de cinétique (24, 72, 120 et 168 heures) sont utilisés pour déterminer la teneur en acides organiques (intermédiaires métaboliques) et les 5 autres embryons sont utilisés pour déterminer les teneurs en huile, en protéines solubles, en amidon et en matière sèche. Ces teneurs sont déterminées selon la méthode décrite dans le Matériels et Méthodes (&2.2.1). 3 répétitions biologiques ont été

effectuées par points de cinétique (10 embryons \* 3). Le milieu de culture est également récupéré pour quantifier les substrats consommés au cours de la cinétique et les substrats résiduels.

#### 2.4.3.2. Concentration des substrats.

Afin de suivre l'évolution de la concentration en glucose et en glutamine, le milieu de culture récolté à 72 et 168 heures a été analysé.

##### 2.4.3.2.1. Concentration en glucose.

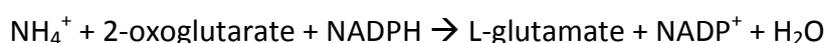
100 µL du milieu de culture récupéré sont ajoutés à 3 mL de réactif GOPOD (glucose oxydase et peroxydase) fourni dans le kit Megazyme (K-TSTA, Megazyme, Irlande). La teneur en glucose est déterminée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 510 nm. La quantification est effectuée en se référant à une gamme étalon établie à partir de concentrations croissantes de D-glucose comme décrit au Matériels et Méthodes (2.2.1.3). La teneur en glucose est exprimée en g/L.

##### 2.4.3.2.2. Concentration en glutamine.

La glutamine est quantifiée selon les recommandations données dans le kit de dosage L-asparagine/L-glutamine/Ammoniaque Mégazyme (K-ASNAM, Megazyme, Irlande). Le dosage de la glutamine se fait de façon indirecte par le dosage de l'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) suivi du dosage de la glutamine et de l'ammonium.

##### ➤ Dosage de l'ammonium :

100 µL de milieu de culture est dilué dans 1,72 mL d'H<sub>2</sub>O distillée. A cette solution diluée sont ajoutés 300 µL de 2-oxoglutarate et sodium azide (0,02 % w/v) et 200 µL de NADPH dissout dans 12 mL d'eau distillée. Après incubation pendant 5 minutes à 22°C, l'absorbance A1 de l'échantillon est lue à 340 nm. L'ajout de 20 µL de glutamate déshydrogénase (GIDH) à l'échantillon permet la formation de NADP<sup>+</sup>, de L-glutamate et de H<sub>2</sub>O à partir du NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, du 2-oxoglutarate et du NADPH selon la réaction (2) suivante :



La concentration en NADP<sup>+</sup> formé est proportionnelle à la consommation d'ammonium. Après 5 minutes d'incubation à 22°C, l'absorbance (A2) est mesurée à 340 nm. Le témoin

négatif est constitué par le milieu réactionnel ne contenant pas de milieu de culture. L'absorbance de l'ammonium ( $\Delta A_{\text{ammonium}}$ ) est déterminée par le calcul suivant :

$$\Delta A_{\text{ammonium}} = (A1-A2)_{\text{échantillon ammonium}} - (A1-A2)_{\text{ammonium témoin}}$$

➤ Dosage de la glutamine et de l'ammonium :

A 100  $\mu\text{L}$  de milieu de culture, sont ajoutés successivement 20  $\mu\text{L}$  d'une solution tampon (sodium azide (0,02% w/v), pH 4,9) et 20  $\mu\text{L}$  de glutaminase. La glutaminase permet la formation de glutamate et de  $\text{NH}_4^+$  à partir de glutamine et d' $\text{H}_2\text{O}$  selon la réaction suivante :



Après une incubation de 5 minutes à 22°C, 1,50 mL d'eau distillée, 300  $\mu\text{L}$  de 2-oxoglutarate et sodium azide (0,02 % w/v) et 200  $\mu\text{L}$  de NADPH dissout dans 12 mL d'eau distillée sont ajoutés. Après incubation pendant 5 minutes à 22°C, l'absorbance A3 de l'échantillon est lue à 340 nm. L'ajout de 20  $\mu\text{L}$  de glutamate déshydrogénase à l'échantillon permet la formation de  $\text{NADP}^+$ , de L-glutamate et d' $\text{H}_2\text{O}$  à partir de  $\text{NH}_4^+$ , de 2-oxoglutarate et de NADPH selon la réaction (2). Après 5 minutes d'incubation à 22°C, l'absorbance (A4) est mesurée à 340 nm. Le témoin négatif est constitué du milieu réactionnel ne contenant pas de milieu de culture. L'absorbance de la glutamine et de l'ammonium ( $\Delta A_{\text{glutamine et ammonium}}$ ) est déterminée par le calcul suivant :

$$\Delta A_{\text{glutamine et ammonium}} = (A3-A4)_{\text{échantillon glutamine et ammonium}} - (A3-A4)_{\text{ammonium et glutamine témoin}}$$

L'absorbance de la glutamine est déterminée par le calcul suivant :

$$\Delta A_{\text{glutamine}} = \Delta A_{\text{glutamine et ammonium}} - \Delta A_{\text{ammonium}}$$

La concentration en glutamine est déterminée par la relation suivante :

$$C = ((V * MW) / (\epsilon * d * v)) * \Delta A_{\text{glutamine}}$$

C : Concentration en glutamine en g/L

MW : Masse moléculaire de la glutamine : 146,14 g/mol

$\epsilon$  : Coefficient d'extinction molaire du NADPH à 340 nm (6 300 ( $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ))

d : Trajet de la lumière (cm)

v : Volume de l'échantillon (mL)

#### 2.4.3.3. Concentration des intermédiaires métaboliques (acides organiques).

##### 2.4.3.3.1. Extraction des acides organiques.

L'extraction des acides organiques est effectuée après broyage des embryons de lin dans l'azote liquide. 1 mL de tampon d'extraction (Tris-HCl 50 mM pH 8,  $\beta$ -mercaptoéthanol 10 mM, EDTA 1 mM, 1 % polyvinyl pyrrolidone (PVP), 0.5 % SDS) est ajouté au broyat. Le mélange est vortexé puis déposé sur 5 mL d'une résine échangeuse d'anions de type Dowex (1X8) préalablement rincée et équilibrée avec 20 mL d'eau distillée. Un premier lavage réalisé avec 5 mL d'eau permet d'éluer les sucres libres puis l'ajout de 20 mL d'acide formique 5 % va servir à éluer les acides organiques de la colonne. La fraction contenant les acides organiques est congelée puis lyophilisée pendant 12 heures. Le lyophilisat est alors repris dans 500  $\mu$ L d'eau MQ et transféré dans des flacons afin d'être analysé en HRLC-MS (ESI-QTOF).

##### 2.4.3.3.2. Quantification des acides organiques.

La méthode d'analyse des acides organiques se fait par HRLC couplée à la spectrométrie de masse (ESI-QTOF Agilent 6538). La séparation des acides organiques s'effectue par passage sur une colonne Dionex Acclaim OA 3 $\mu$ m 120A 2.1\*150mm sous un débit de 0,5 mL/minutes d'acide formique 0,2 %. A la sortie de la colonne chromatographique, les molécules éluées sont identifiées par spectrométrie de masse. L'ionisation des molécules est effectuée par une Dual ESI «Electrospray» en mode négative. La température de la source est de 350°C avec un fragmenteur de 120V et une valeur de Skimmer 65 V. La gamme de masse détectée sur le quadrupole-temps de vol (QTOF) est de 100 m/z à 3000 m/z. Les acides organiques sont identifiés par recherche de la masse exacte et du temps de rétention des standards de succinate, fumarate, cétooglutarate, citrate, isocitrate et malate. Les différents sucres sont quantifiés en utilisant un étalon interne (acide caféique à 20  $\mu$ g/mL) et une gamme étalon réalisée avec du succinate, du fumarate et du malate avec des concentrations allant de 0 ng/ml à 100 ng/mL.

#### 2.4.3.4. Concentration des composés de réserves.

L'extraction et la quantification des huiles, protéines et amidon dans les embryons incubés sont réalisées selon le protocole décrit dans le "Matériels et Méthodes" (& 2.2.1).

#### 2.4.4. Etat isotopique stationnaire.

##### 2.4.4.1. Culture des embryons.

Après culture des plantes et étiquetage journalier des fleurs (Matériels et Méthodes, &1.2), les capsules âgées de 16 JAF (Jours Après Floraison) sont récoltées, stérilisées et décortiquées selon les conditions décrites au Matériels et Méthodes (&2.4.1). 10 embryons sont placés dans une boîte de Pétri contenant 9 mL de milieu de culture et incubés pendant 24, 72, 120 et 168 heures comme décrit au Matériels et Méthodes (&2.4.1). Le glucose du milieu de culture est composé de 20 % de [U- $^{13}\text{C}_6$ ] glucose et de 80 % de glucose non marqué. La glutamine du milieu de culture est composée de 20 % de [U- $^{13}\text{C}_5$ ] glutamine et de 80 % de glutamine non marqué. 3 boîtes de Pétri contenant chacune 10 embryons par point de cinétique ont été utilisées. Après incubation, les embryons sont récupérés, lavés et lyophilisés comme décrit au Matériels et Méthodes (&2.4.1). L'extraction des différents métabolites se fait de manière séquentielle selon le protocole décrit par Koubaa *et al.* (2013). Les huiles sont d'abord extraites, puis les composés solubles (acides aminés, sucres, acides organiques) et l'amidon sont extraits. 3 répétitions biologiques ont été effectuées par points de cinétique (10 embryons \* 3).

##### 2.4.4.2. Extraction des métabolites.

###### 2.4.4.2.1. Extraction et séparation des acides gras.

L'extraction des lipides est effectuée selon le protocole décrit en Matériels et Méthodes (2.2.1.1.) L'obtention des esters méthyliques d'acides gras et les conditions de leur analyse en GC-MS (CI-QQQ) ont été définies au paragraphe 2.2.2. du Matériels et Méthodes.

###### 2.4.4.2.2. Extraction et séparation des éléments solubles.

Après avoir séché, sous flux d'azote à 60°C, le culot obtenu après extraction des triglycérides, celui-ci est repris dans 1 mL d'H<sub>2</sub>O bouillante et placé dans un bain marie à 100°C pendant 5 minutes. L'échantillon est refroidi rapidement dans la glace durant 5 minutes. Après centrifugation à 12 000 rpm, 4°C pendant 15 minutes, le surnageant (1 mL) est filtré (0.25 µm) et récupéré. Afin d'extraire le maximum de composés solubles, une seconde extraction est effectuée sur le culot. Les surnageants filtrés (2 mL) sont regroupés, congelés et lyophilisés avant d'être analysés en HPLC-MS. Le lyophilisat contenant les acides

aminés libres, les acides organiques, ainsi que les sucres libres est repris dans 500 mL d'H<sub>2</sub>O. Les acides organiques et les sucres libres seront analysés en HRLC-MS (ESI-QTOF) alors que les acides aminés libres seront analysés en EC-MS (ESI-QTOF).

#### 2.4.4.2.3. Extraction de l'amidon.

Sur le culot obtenu lors de l'extraction des composés solubles, l'extraction de l'amidon et son hydrolyse sont effectués selon la méthode décrite dans le Matériels et Méthodes (& 2.2.1.3). Le glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon est ensuite analysé en HRLC-MS (ESI-QTOF).

#### 2.4.4.3. Détermination des enrichissements isotopiques.

Afin d'obtenir les données nécessaires à l'élaboration des cartes de flux, il est nécessaire de séparer les différentes métabolites. L'HRLC-MS (ESI-QTOF) est utilisé pour doser les acides organiques, les sucres, l'amidon. La GC-MS (EI-QQQ) est utilisé pour doser les esters méthyliques d'acides gras et l'EC-MS (ESI-QTOF) pour doser les acides aminés libres.

##### 2.4.4.3.1. Dosage des acides gras.

La séparation des esters méthyliques d'acides gras est effectuée en GC-MS (EI-QQQ) selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.2. (Matériels et Méthodes). Dans ces conditions, les différents acides gras sont correctement séparés mais le type d'ionisation est très énergétique (Impact électronique). La fragmentation de la molécule ne permet pas l'accès à l'ion moléculaire. L'enrichissement isotopique en <sup>13</sup>C ne pourra être déterminé que sur les acides gras saturés en exploitant le fragment de Mc Lafferty contenant les 2 derniers carbones de la chaîne des acides gras.

##### 2.4.4.3.2. Dosage des sucres libres et de l'amidon.

La séparation des sucres libres et la détermination des enrichissements isotopiques sur ces composés sont effectuées en HRLC-MS (ESI-QTOF) selon la méthode décrite au paragraphe 2.2.5.2. (Matériels et Méthodes). L'enrichissement isotopique est déterminé à partir du massif isotopique de l'ion moléculaire de chaque composé.

#### 2.4.4.3.3. Dosage des acides organiques libres.

La séparation des acides organiques libres et la détermination des enrichissements isotopiques des acides organiques sont effectuées en HRLC-MS (ESI-QTOF) selon la méthode décrite au paragraphe 2.4.3.2. (Matériels et Méthodes). L'enrichissement isotopique est déterminé à partir du massif isotopique de l'ion moléculaire de chaque composé.

#### 2.4.4.3.4. Dosage des acides aminés libres.

Le dosage des acides aminés libres est effectué par électrophorèse capillaire (Agilent 7100) couplée à la spectrométrie de masse (DualESI-QTOF Agilent 6538). La séparation s'effectue sous un champ électrique de 25 Kvolt, le long d'un capillaire de 120 cm\*50µm avec un tampon d'acide formique 1M. Le temps de chargement est de 40 secondes sous 100 mbar. Un liquide additionnel (eau : méthanol (1 :1) et 2,5 µmol d'acétate d'ammonium, 40 µL de chaque ion de références (Purine, HP 921, TFA)), est ajouté au niveau de la source avec un débit de 4 µL.minute<sup>-1</sup> afin de permettre une ionisation plus efficace de l'échantillon. A la sortie du capillaire de l'électrophorèse capillaire, les acides aminés élués sont ionisés dans une source Dual ESI «Electrospray» en mode positive à 250°C, puis identifiés par leurs masses exactes [M+H<sup>+</sup>] au niveau du spectromètre de masse (QTOF), mais également par leur temps de rétention en référence à celui des standards des 20 acides aminés.

#### 2.4.4.4. Correction de l'abondance naturelle.

Après séparation des métabolites, les informations obtenues à partir des spectres de masses sont utilisées et exploitées pour déterminer les enrichissements isotopiques. La première étape consiste à enregistrer l'intensité de chaque pic en ramenant à 1 le total des masses de  $m_0$  jusqu'à  $m_n$  comme représenté sur la formule ci-dessous (Nanchen *et al.*, 2007).

$$\text{MDV}_\alpha = \begin{bmatrix} (m_0) \\ (m_1) \\ \vdots \\ (m_n) \end{bmatrix} \text{ avec } \sum_{i=0}^n m_i = 1$$

Le massif isotopique obtenu est un massif brut qui dépend de l'ensemble des isotopes présents dans la molécule (13C, 2H, 18O, ...). Pour obtenir la distribution des isotopomères du 13C, le massif isotopique est corrigé de l'abondance naturelle des isotopes autres que les carbones constituant la molécule. Pour enlever cette abondance naturelle, un

algorithme est conçu en se basant sur la multiplication de la matrice des isotopomères générés expérimentalement par l'inverse d'une matrice de même dimension et contenant l'abondance naturelle de chaque atome :

$$MDV_{\alpha}^* = C_{\text{corr,CONHSiS}}^{-1} \cdot MDV_{\alpha}$$

$MDV_{\alpha}^*$  est la matrice des isotopomères corrigés de l'abondance naturelle

$C_{\text{corr,CONHSiS}}^{-1}$  est la matrice de l'abondance naturelle inversée.

La matrice correctrice  $C_{\text{corr,CONHSiS}}$  est calculée à partir de la multiplication des matrices de chaque atome constituant la molécule analysée comme suit :

$$C_{\text{corr,CONHSiS}} = C_{\text{corr,C}} \cdot C_{\text{corr,O}} \cdot C_{\text{corr,N}} \cdot C_{\text{corr,H}} \cdot C_{\text{corr,Si}} \cdot C_{\text{corr,S}}$$

Les matrices individuelles de chaque atome sont déterminées selon le nombre de mesures effectuées et le nombre d'atomes constituant la molécule (Nanchen *et al.*, 2007). Les valeurs de cette matrice correspondent à une somme de 1.

#### 2.4.4.5. Enrichissement moyen.

L'enrichissement moyen (EM) ou marquage fractionnel des différents ions moléculaires analysés a été calculé selon la relation suivante :

$$EM = \frac{\sum_{i=0}^n i \cdot m_i}{n \cdot \sum_{i=0}^n m_i}$$

Avec n représentant le nombre d'atomes de carbones dans le fragment et i les différentes masses d'isotopomères.

Exemple : pour un fragment contenant 6 atomes de carbones et présentant des masses d'isotopomères allant de  $m_0$  jusqu'à  $m_6$ , l'enrichissement moyen sera calculé de manière suivante :

$$EM_{\text{expérimental}} = \frac{0 \cdot m_0 + 1 \cdot m_1 + 2 \cdot m_2 + 3 \cdot m_3 + 4 \cdot m_4 + 5 \cdot m_5 + 6 \cdot m_6}{6 (m_0 + m_1 + m_2 + m_3 + m_4 + m_5 + m_6)}$$

#### 2.4.5. Construction du modèle.

Le modèle a été élaboré à partir des données des analyses protéomiques effectuées dans les embryons de lin au cours de la phase de maturation (Barvkar *et al.*, 2012 ; Klubicová *et al.*, 2013), des données provenant de l'analyse des flux métaboliques d'embryons

photosynthétiques (Schwender *et al.*, 2003 ; Schwender *et al.*, 2004 ; Lonien et Schwender, 2009) et de l'analyses des enrichissements isotopiques après incubation d'embryons de lin en présence de substrats marqués.

La culture des plantes et l'étiquetage des fleurs ont été effectués comme décrit (Matériels et Méthodes, 1.2.). Les capsules âgées de 16 JAF ont été récoltées, stérilisées et décortiquées selon les conditions décrites dans la partie Matériels et Méthodes (&2.4.1). 10 embryons sont cultivés en boîte de Pétri dans 9 mL de milieu de culture pendant 168 heures (Matériels et Méthodes: & 2.4.1). Le glucose du milieu de culture est composé de 20 % de glucose marqué ([1-13C<sub>6</sub>]) et de 80 % de glucose non marqué. La glutamine du milieu de culture est non marquée. 3 boîtes de Pétri ont été mises en culture.

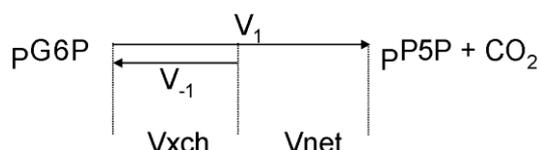
10 embryons ont également été placés dans une boîte de Pétri contenant 9 mL de milieu de culture et incubés pendant 168 heures en présence de glucose non marqué et de glutamine marqué [U-13C<sub>5</sub>]. Trois boîtes de Pétri (contenant 10 embryons) ont été cultivées.

Après incubation, les embryons sont récupérés, lavés et lyophilisés comme décrit dans le Matériels et Méthodes (&2.4.1). L'extraction des composés, la détermination des enrichissements isotopiques et la correction de l'abondance naturelle sont effectuées sur les acides gras, les acides organiques et les sucres libres comme décrit dans le Matériels et Méthodes (&2.4.4).

#### 2.4.6. Calcul des flux métaboliques.

##### 2.4.6.1. Principe du logiciel SYSTMETAB.

Le logiciel de calcul de flux utilisé dans ce travail est le logiciel SYSTMETAB permettant l'estimation des flux nets et des flux d'échanges (**Figure 34**) à partir de la mesure des flux extracellulaires et des données de marquage. Ce logiciel a été développé dans le cadre du programme SYSMETAB (2006-2008) en collaboration avec le Dr. Stéphane Mottelet (Laboratoire de Mathématiques Appliquées de Compiègne (LMAC, EA222), UTC, Compiègne) et adapté au modèle plante (programme PIVERT-GENESYS : MetaLipPro-PL1, 2012-2015).



**Figure 34 : Définition des flux nets et des flux d'échange d'après Wiechert *et al.* (2001).**

Abréviations : pG6P : glucose 6 phosphate plastidial ; pP5P : ribulose 5 phosphate plastidial ; CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone ; V<sub>xch</sub> : flux d'échange ; V<sub>net</sub> : flux net.

Flux net :  $V_{net} = V_1 - V_{-1}$

Flux d'échange :  $V_{xch} = \min(V_1, V_{-1})$ .

Dans le cas d'une réaction irréversible, le flux d'échange est considéré comme égal à 0 (Wiechert *et al.*, 2001).

L'obtention de ces données nécessite la création d'un fichier ftbl qui doit suivre des règles bien définies pour ne pas rencontrer des erreurs de syntaxe en l'exécutant par le logiciel SYSTMETAB.

La rédaction de ce fichier se fera en suivant les étapes suivantes :

- Déclaration du réseau métabolique dans la partie intitulée «NETWORK».
- Déclaration des flux des réactions saisies dans la partie intitulée «FLUXES».
- Déclaration des égalités et des inégalités dans la partie intitulée «EQUALITIES».
- Déclaration de l'abondance naturelle en <sup>13</sup>C des métabolites dans la partie intitulée «LABEL\_INPUT».
- Déclaration des isotopomères de masses dans la partie intitulée «MASS\_SPECTROMETRY».

#### 2.4.6.2. Création du fichier ftbl.

##### 2.4.6.2.1. Déclaration du réseau métabolique «NETWORK»

Le réseau établi contient les éléments suivants :

- Les réactions du métabolisme central (glycolyse cytosolique, glycolyse plastidiale, cycle de Krebs, voie des pentoses phosphates ...).
- Les réactions de transport entre le cytosol, les mitochondries et les chloroplastes.
- Les réactions de biosynthèse des macromolécules (acides aminés, acides gras, amidon, parois).
- Les précurseurs carbonés associés au métabolisme central utilisés pour la synthèse des macromolécules.
- La compartimentation (plastides, mitochondries, cytosol).

2.4.6.2.2. Déclaration des flux des réactions métaboliques  
«FLUXES».

Les flux des réactions déclarées dans le réseau sont classés en 3 catégories selon la réaction mise en jeu :

- Des flux constants (C) prenant des valeurs non modifiées au cours du processus d'optimisation des flux.
- Des flux libres (F) prenant des valeurs pouvant être modifiées au cours du processus d'optimisation.
- Des flux dépendants (D) dont les valeurs sont déterminées à partir des flux libres et des flux constants.

Les flux constants sont déterminés à partir des données d'enrichissement après incubation d'embryons en présence de substrats marqués (20 % [1-13C<sub>1</sub>] glucose ; 100 % [U-13C<sub>5</sub>] glutamine). Les flux libres sont déterminés à partir des mesures de vitesse de synthèse de chaque composé et intégrés dans la section «FLUX\_MEASUREMENTS».

2.4.6.2.3. Déclaration des «EQUALITIES» et  
«INEQUALITIES».

Les sections «EQUALITIES» et «INEQUALITIES» ont été rédigées à partir des données d'enrichissements après incubation des embryons en présence de substrats marqués (20 % [1-13C<sub>1</sub>] glucose ; 100 % [U-13C<sub>5</sub>] glutamine). Ces données ont permis de créer le réseau et les mesures de vitesse de synthèse des composés ont été intégrées dans la section «FLUX\_MEASUREMENTS».

2.4.6.2.4. Intégration des mesures des flux extracellulaires  
«FLUX MEASUREMENTS».

- Détermination des flux extracellulaires de synthèse.

10 embryons des lignées *Astral* et/ou *238* âgés de 16 JAF ont été incubés pendant 168 heures dans 16 mL de milieu de culture (Matériels et Méthodes: & 2.4.1). Le glucose présent dans le milieu de culture est marqué à 60 % en [U-13C<sub>6</sub>] glucose et à 40 % en [2-13C<sub>1,2</sub>] glucose. La glutamine présente dans le milieu de culture est non marquée. Pour chaque lignée de lin, 3 boîtes de Pétri ont servi à l'expérimentation.

Après incubation, 5 embryons sont récupérés, lavés lyophilisés (Matériels et Méthodes: &2.4.1). L'extraction et la quantification des huiles, protéines et amidon sont effectuées comme précédemment décrit (Matériels et Méthodes : &2.2.1). Les protéines sont hydrolysées et les acides aminés ont été quantifiés selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes (&2.2.3). Parallèlement, des embryons âgés de 16 JAF ont été récoltés, congelés à l'azote liquide et lyophilisés. Les huiles, protéines, acides aminés, amidon ont été quantifiés selon les protocoles décrits dans la partie Matériels et Méthodes (&2.2.1. et &2.2.3). Les vitesses de synthèse de ces composés ont été déterminées en  $\text{nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ .

➤ Détermination des flux extracellulaires consommés.

Après incubation des embryons, le milieu de culture est récupéré et dilué comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes (&2.4.3.2). Les quantifications du glucose et de la glutamine dans le milieu de culture avant et après incubation des embryons sont réalisées selon la méthode décrite dans la partie Matériels et Méthodes (&2.4.3.2). Les vitesses de consommation du glucose et de la glutamine ont été déterminées en  $\text{nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ .

2.4.6.2.5. Déclaration des substrats «LABEL INPUT».

Dans la section «LABEL\_INPUT», tous les substrats utilisés dans l'expérience qu'ils soient marqués ou non marqués ont été déclarés. Les embryons des lignées *Astral* et 238 âgés de 16 JAF ont été incubés pendant 168 heures dans un milieu de culture (Matériels et Méthodes: & 2.4.1.) contenant 60 % de [U- $^{13}\text{C}_6$ ]-glucose et 40 % de [2- $^{13}\text{C}_{1,2}$ ]-glucose, et 100 % de glutamine non marqué.

2.4.6.2.6. Intégration des mesures des enrichissements isotopiques «MASS SPECTROMETRY».

La section «MASS\_SPECTROMETRY» contient les mesures des enrichissements isotopiques effectuées en GC-MS, HPLC-MS de l'ensemble des fragments des métabolites ou de l'ion moléculaire de chaque molécule. La mesure des enrichissements isotopiques est effectuée à partir de 5 embryons incubés suivant le protocole décrit précédemment. Les acides gras, sucres libres et acides organiques sont extraits et les enrichissements isotopiques déterminés comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes (& 2.4.4.3. et & 2.4.4.4).

### 2.4.6.3. Conversion du fichier ftbl en fichier fml.

Le fichier ftbl est converti en un fichier fml par le logiciel SYSTMETAB. Le calcul des flux et la minimisation des erreurs sont effectués par le logiciel SYSTMETAB à partir du fichier fml.

### 2.4.7. Calcul des flux et minimisation des erreurs.

Les flux nets et les flux d'échanges sont calculés par le logiciel SYSTMETAB à partir des données d'enrichissements («MASS SPECTROMETRY»), des flux extracellulaires mesurées par «FLUX\_MEASUREMENTS», du réseau métabolique «NETWORK», des flux déclarés dans «FLUXES», des contraintes «EQUALITIES» «INEQUALITIES» et des substrats intégrés dans la section «LABEL\_INPUT». Une étape de minimisation des erreurs utilisant le  $\chi^2$  global comme fonction d'optimisation (résidu de minimisation) des flux bruts permet l'obtention d'un minimum local au niveau duquel les erreurs observées entre les valeurs expérimentales et les valeurs théoriques sont minimales. Cette opération est réalisée de façon itérative en comparant le nouveau jeu de flux avec le précédent jusqu'à atteindre un optimum. Cet optimum est vérifié après avoir calculé la somme des résidus de minimisation donnée par la formule suivante :

$$\sum_{j=1-n} \frac{\left(m_j^{\text{experimental}} - m_j^{\text{predicted}}\right)^2}{\sigma_j^2}$$

- n est le nombre de mesures expérimentales.
- $\sigma$  correspond à la déviation de cette mesure.
- $m_j^{\text{experimental}}$  correspond à une mesure expérimentale.
- $m_j^{\text{predicted}}$  correspond à une mesure théorique.

Le calcul des flux est effectué par la méthode de Monte-Carlo (Metropolis et Ulam, 1949). Plusieurs flux nets d'échange ne sont pas ou mal déterminés par les données de marquage. Négliger l'incertitude statistique dans ces flux pourrait conduire à une sous-estimation significative de la taille des limites de confiance pour les flux d'intérêts restants. Par conséquent, les mesures de qualité statistiques ont été calculées par simulation stochastique de Monte-Carlo. L'optimisation répétée a donné lieu à des vecteurs de flux. Pour chaque flux, la moyenne et l'écart-type ont été calculés.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

### **CHAPITRE 1 : CARACTERISATIONS PHENOTYPIQUE ET BIOCHIMIQUE DES LIGNEES DE LIN.**

#### **1.1. Caractérisation phénotypique des lignées de lin.**

Les lignées de lin (*Astral*, 238) retenues pour cette étude, ont été sélectionnées pour leurs teneurs différentes en huile contenues dans les graines, *Astral* accumulant plus d'huile que 238. Dans la littérature et pour des différences similaires observées, des facteurs physiologiques ainsi que des facteurs contrôlant le développement de plante et de la graine ont été incriminés (Baud et Lepiniec, 2010). L'étude des caractérisations physiologiques et phénotypiques des plantes et des graines ainsi que les caractérisations biochimiques des graines des deux lignées de lin serviront à émettre des hypothèses sur la nature des facteurs potentiels influençant la teneur en huile. Ces travaux devraient nous permettre de comprendre pourquoi les graines de la lignée 238 accumulent moins d'huile que les graines de la lignée *Astral*.

##### **1.1.1. Caractérisation physiologique des lignées de lin.**

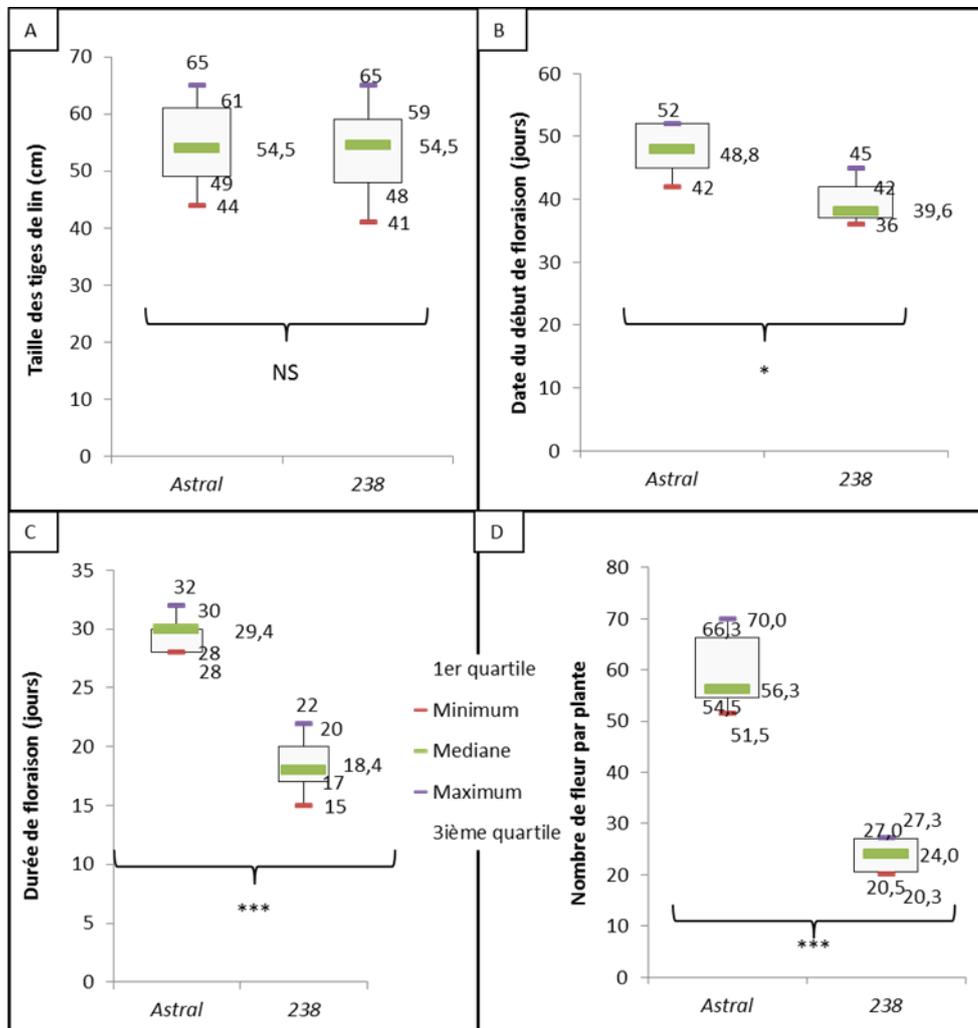
Afin de déterminer si les deux plantes sélectionnées (*Astral*, 238) (**Figure 35**) présentent des différences physiologiques et/ou phénotypiques importantes, les critères liés au développement des plantes tels que la taille de la tige, les dates de début et de fin de floraison, le nombre de fleurs par plante, ont été suivis. Ces critères ont été retenus pour suivre leurs évolutions au cours de la croissance des plantes (**Figure 36**).



**Figure 35 : Photographie des deux lignées de lin au cours de la floraison.**

A : *Astral* ; B : 238

La mesure de la taille des tiges de la base de la plante à la première ramification a montré que la taille des tiges est significativement semblable (environ 54 cm ; **Figure 35** ; **Figure 36 A**) pour les deux lignées de lin *Astral* et 238. Toutefois et pour ces deux plantes, des différences ont été observées au niveau de la date de début de floraison après semis, de la durée de floraison et du nombre de fleurs par plante. En effet, alors que la lignée *Astral* débute sa floraison après 49 jours après semis (**Figure 36 B**), la lignée 238 a un début de floraison, après semis, plus précoce (40 jours ;  $p < 0,05$ ). La durée de la floraison est de 29 jours pour *Astral* (**Figure 36 C**) avec une production moyenne de 56,3 fleurs par plante (**Figure 36 D**) alors qu'elle n'est que de 18 jours ( $p < 0,001$ ) pour 238 avec un nombre de fleurs généré plus faible (24 fleurs par plante ;  $p < 0,001$ ).



**Figure 36 : Caractères phénotypiques et physiologiques des deux lignées de lin.**

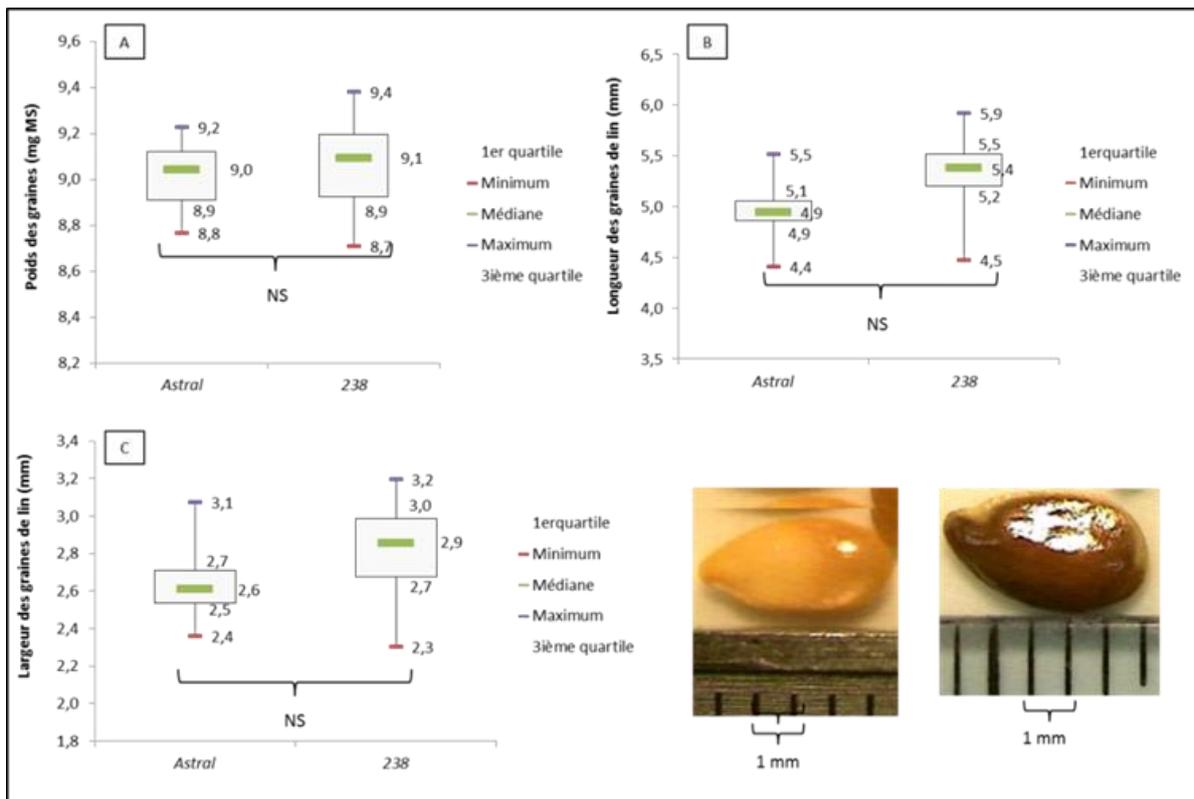
A : Taille de la tige ; B : Date du début de floraison après semis ; C : Durée de floraison ; D : Nombre de fleurs par plante. L'analyse statistique a été effectuée sur 100 plantes pour chaque lignée provenant de 5 plantations cultivées entre le 15 octobre 2011 et le 30 janvier 2014.

$p > 0,05$  = NS ;  $p < 0,05$  : \* ;  $p < 0,01$  : \*\* ;  $p < 0,001$  : \*\*\*.

Les différences observées sur la précocité, la durée de la floraison et le nombre de fleurs vont nous donner des indications sur les retards éventuels de développement qui pourraient être observés par la suite pour les deux lignées sélectionnées. Ces différences pourraient indiquer un rendement de production plus important pour la lignée *Astral*.

### 1.1.2. Caractérisation phénotypique des graines matures de lin.

Les graines des deux lignées de lin sélectionnées ont été caractérisées, dans un premier temps, en utilisant les critères de taille (longueur, largeur) et de poids des graines récoltées à maturité. Bien que la lignée *Astral* présente une durée de floraison et une date de début de floraison plus tardive que la lignée 238, le poids et la taille de ses graines sont statistiquement semblables à ceux de la lignée 238 (**Figure 37 A,B,C**). La précocité de la lignée 238, n'influe donc pas sur le poids et la taille de ses graines.



**Figure 37 : Caractères phénotypiques des graines des deux lignées de lin.**

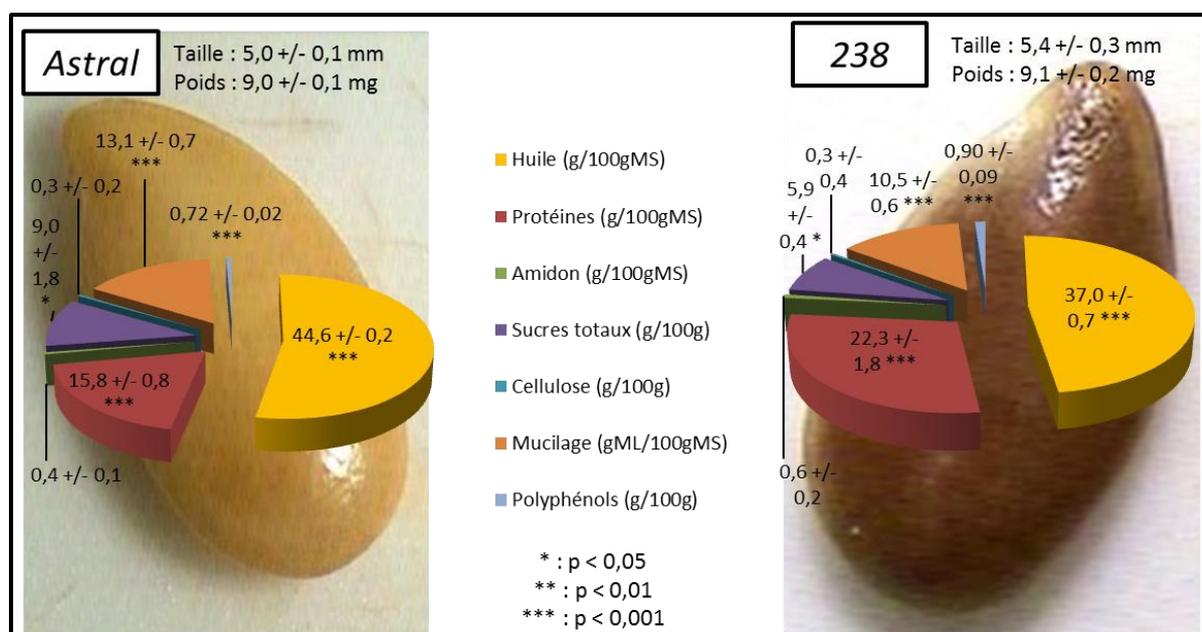
A : poids des graines de lin séchées à l'étuve à 100°C pendant 24h (mg/MS) ; B : longueur des graines de lin (mm) ; C : largeur des graines de lin (mm) ; D : photographie de la graine *Astral* ; E : photographie de la graine 238. L'analyse statistique a été effectuée sur 100 graines matures provenant de 5 plantations (20 graines par plantation). Les cultures de ces plantes ont été effectuées entre le 15 octobre 2011 et le 30 janvier 2014.  $p > 0.05$  : NS ;  $p < 0.05$  : \* ;  $p < 0.01$  : \*\* ;  $p < 0.001$  : \*\*\*.

Pour ces deux lignées, les graines matures présentent toutefois une différence au niveau de la couleur de leurs téguments (**Figure 37 D, E**). En effet, alors que la lignée 238

présente un tégument totalement marron (**Figure 37 E**), la lignée *Astral* a un tégument translucide laissant apparaître la couleur jaune de l'embryon (**Figure 37 D**). Cette différence semble indiquer une présence de composés pigmentaires différents entre les deux lignées de lin.

### 1.2. Caractérisation biochimique des graines de lin.

La caractérisation biochimique des graines matures de lin a été effectuée en mesurant les teneurs en lipides, protéines solubles, sucres totaux, amidon, mucilage, cellulose et polyphénols de ces graines. Ces données serviront à évaluer les différences d'accumulation des composés de réserves dans les graines de lin. Les graines de lin sont composées majoritaires de lipides (30 à 45 g/100g MS), de protéines solubles (10 à 30 g/100g MS), de mucilage (6 à 8 g/100g MS), de sucres totaux (5 et 15 g/100g MS), et minoritairement d'amidon, de polyphénols et de cellulose (< 1 g/100g MS) (Nesbitt *et al.*, 1999 ; Czemplik *et al.*, 2011 ; Venglat *et al.*, 2011). La caractérisation biochimique des graines matures de nos deux lignées de lin (**Figure 38**) a montré que les deux lignées présentent des teneurs similaires à celles reportées dans la littérature (Nesbitt *et al.*, 1999 ; Czemplik *et al.*, 2011 ; Venglat *et al.*, 2011). Cependant, ces deux lignées présentent des différences significatives au niveau de leurs productions d'huile et de protéines.

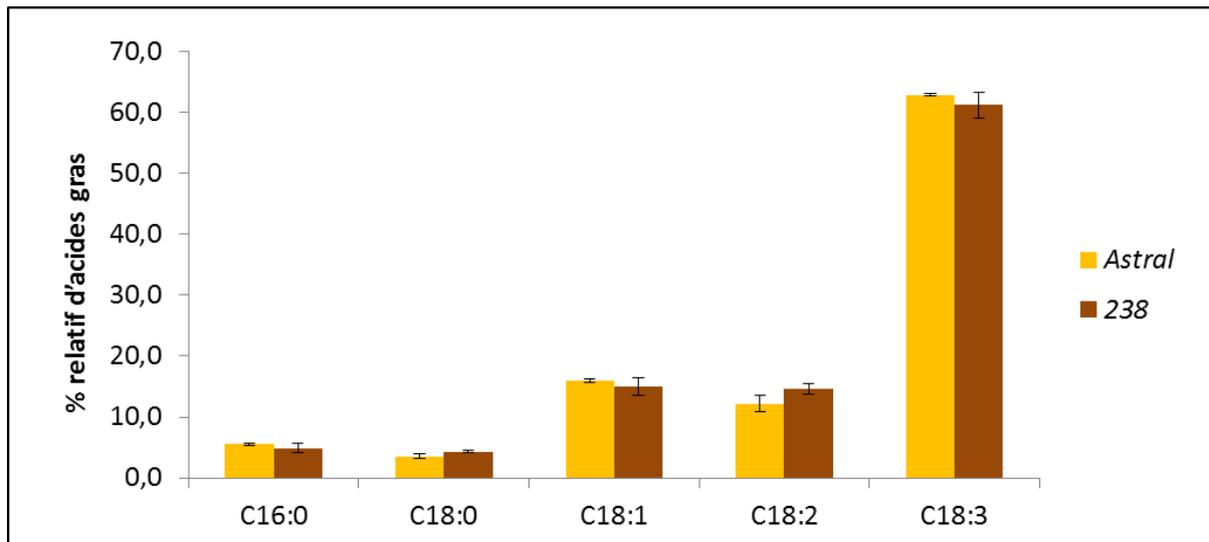


**Figure 38 : Caractérisation biochimique des graines matures de lin.**

L'analyse statistique a été effectuée pour 5 répétitions biologiques. Les cultures de ces plantes ont été effectuées entre le 15 octobre 2011 et le 30 janvier 2014. p>0.05 : NS ; p<0.05 : \* ; p<0.01 : \*\* ; p< 0.001 : \*\*\*. MS : matière sèche. ML : matière lyophilisée.

### 1.2.1. Composés lipidiques dans les graines de lin matures.

Les deux lignées de lin sélectionnées dans ce travail présentent des teneurs en huile différentes. En effet, l'analyse statistique (Test de Student) réalisée sur les graines entières de lin (**Figure 38**) a montré que la lignée *Astral* accumule statistiquement ( $p < 0.001$ ) plus d'huile ( $44,6 \pm 0,2$  g/100g MS) que la lignée 238 ( $37,0 \pm 0,7$  g/100g MS). La composition en acides gras, dans ces huiles, a été déterminée après préparation des esters méthyliques et analyse par GC-MS (**Figure 39**).



**Figure 39 : Profil en acides gras dans les graines matures d'*Astral* et 238.**

L'analyse statistique a été effectuée pour 5 répétitions biologiques. Les cultures de ces plantes ont été effectuées entre le 15 octobre 2011 et le 30 janvier 2014. MS : matière sèche. ML : matière lyophilisée.  $p > 0.05$  : NS ;  $p < 0.05$  : \* ;  $p < 0.01$  : \*\* ;  $p < 0.001$  : \*\*\*.

Dans les graines matures des deux lignées sélectionnées, 5 acides gras majoritaires ont été identifiés : l'acide palmitique (C16:0), l'acide stéarique (C18:0), l'acide oléique (C18:1), l'acide linoléique (C18:2) et l'acide linoléique (C18:3). Les deux lignées présentent majoritairement de l'acide linoléique (C18:3 : *Astral* :  $62,9 \pm 0,2$  % et 238 :  $61 \pm 2$  %), et minoritairement de l'acide linoléique (C18:2 : *Astral* :  $12 \pm 1$  % et 238 :  $14,6 \pm 0,9$  %), de l'acide oléique (C18:1 ; *Astral* :  $15,9 \pm 0,3$  % et 238 :  $15 \pm 2$  %), de l'acide stéarique (C18:0 ; *Astral* :  $3,5 \pm 0,4$  % et 238 :  $4,3 \pm 0,2$  %) et de l'acide palmitique (C16:0 ; *Astral* :  $5,5 \pm 0,2$  % et 238 :  $4,9 \pm 0,7$  %). Ces profils en acides gras sont similaires à ceux rapportés dans la littérature (Froment *et al.*, 1999 ; Lafond *et al.*, 2008) et aucune différence significative entre les graines matures *Astral* et 238 n'a pu être mise en évidence. Ces résultats montrent que, seules, les quantités d'huiles sont affectées dans les graines de la lignée 238 par rapport aux graines de la lignée *Astral* alors que le profil en acides gras est conservé.

### **1.2.2. Composés glucidiques dans les graines de lin matures.**

L'analyse statistique réalisée sur les graines entières de lin a montré que la lignée présentant le plus d'huile (*Astral*) présente statistiquement ( $p < 0,05$ ) plus de sucres totaux ( $9 \pm 2$  g/100g MS) que la lignée 238 ( $5,9 \pm 0,4$  g/100g MS) (**Figure 38**). La teneur plus élevée en ces composés pourrait témoigner d'une accumulation plus importante des différents composés sucrés (mucilage, sucres libres, cellulose, amidon, parois cellulaires) dans les graines de lin. Les analyses statistiques effectuées sur les teneurs en cellulose et en amidon n'ont pas permis de montrer de teneurs différentes entre les deux lignées sélectionnées. Par contre, des différences significatives dans les teneurs en mucilage et en sucres libres ont été notées dans les graines des deux lignées sélectionnées (**Figure 38**).

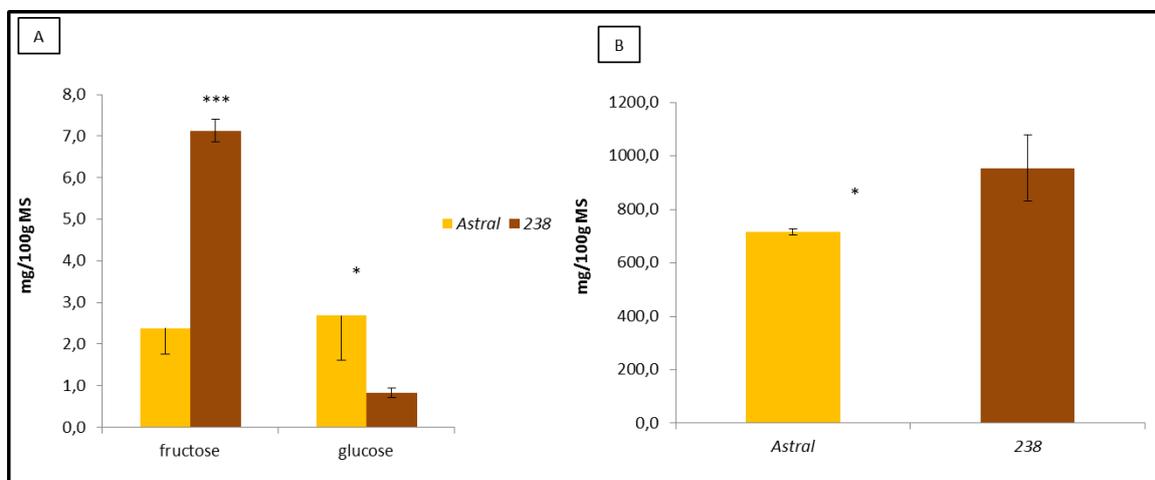
#### **1.2.2.1. Teneur en mucilage dans les graines de lin.**

L'analyse statistique (Test de Student) effectuée sur les teneurs en composés dans les deux lignées a montré que la lignée *Astral* produisant statistiquement ( $p < 0,001$ ) le plus d'huile produit aussi statistiquement ( $p < 0,001$ ) plus de mucilage respectivement  $13,1 \pm 0,7$  gML/100gMS pour  $10,5 \pm 0,6$  gML/100gMS pour la lignée 238 (**Figure 38**). Les teneurs en mucilage observées dans les graines pourraient être liées aux teneurs en lipides trouvées dans ces graines de lin. En effet, les travaux effectués par Shen *et al.* (2006) et Shi *et al.* (2012) ont montré qu'une mutation dans les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du mucilage chez *Arabidopsis thaliana* pouvait engendrer une modification des teneurs en mucilage mais aussi en huile dans leurs graines. Une analyse transcriptomique des graines de nos deux lignées de lin pourrait permettre d'identifier si les gènes impliqués dans ces voies de biosynthèse sont ou non différentiellement exprimés dans les graines de lin.

#### **1.2.2.2. Teneur en sucres solubles dans les graines de lin.**

L'analyse des sucres libres dans les graines des deux lignées de lin sélectionnées a montré que les graines accumulent majoritairement du saccharose et minoritairement du glucose et du fructose (**Figures 40 A, B**). L'analyse statistique des teneurs de ces composés dans les graines de ces deux lignées a montré des différences significatives. En effet, la lignée produisant le plus d'huile (*Astral*), présente au niveau de ses graines matures, des teneurs plus élevées en glucose (*Astral*:  $2,7 \pm 0,3$  mg/100 gMS) que la lignée 238

( $0,8 \pm 0,1$  mg/100 gMS) ( $p < 0,05$ ), des teneurs en fructose plus faible (*Astral* :  $2,4 \pm 0,6$  mg/100 gMS; 238 :  $7,1 \pm 0,3$  mg/100gMS) ( $p < 0,001$ ) et des teneurs en saccharose plus faible (*Astral* :  $716 \pm 10$  mg/100g MS; 238 :  $950 \pm 120$  mg/100g MS) ( $p < 0,05$ ) (Figures 40 A, B).



**Figure 40 : Teneur en sucres libres dans les graines de lin .**

A : Teneur en fructose et en glucose dans les graines de lin.

B : Teneur en saccharose dans les graines de lin.

L'analyse statistique a été effectuée sur 3 répétitions biologiques. Les cultures de ces plantes ont été effectuées entre le 15 octobre 2011 et le 30 janvier 2014. MS : matière sèche. ML : matière lyophilisée.  $p > 0,05$  : NS ;  $p < 0,05$  : \* ;  $p < 0,01$  : \*\* ;  $p < 0,001$ .

Ces composés utilisés lors de la glycolyse, pourraient conduire à une accumulation de saccharose et de fructose plus importante au détriment de la teneur en huile pour la lignée 238 par rapport à la lignée *Astral*. Des résultats similaires ont été observés avec des mutants présentant un phénotype "huile" tels que des mutants de gènes codant pour des facteurs de transcription, des mutants de gènes codant pour des enzymes de la glycolyse cytosolique et plastidiale tel que la pyruvate kinase (Lonien et Schwender, 2009), de la pyrophosphatase (Meyer *et al.*, 2012) ou de gènes contrôlant les facteurs physiologiques de l'accumulation des huiles (Vigeolas *et al.*, 2011). Dans ces différents mutants, la synthèse des acides gras était réduite et semblait être due à un taux de remobilisation du saccharose et du fructose (précurseurs des acides gras) plus faible qui peut être tributaire de nombreux facteurs tels que des facteurs physiologiques (limitation d'oxygène, influence de la température, ...) ou des activités enzymatiques du métabolisme carboné (Baud et Lepiniec, 2010).

Le turn-over des carbones au niveau du glucose, fructose, saccharose et l'utilisation de ces composés pour la synthèse des acides gras sembleraient être affectés dans la lignée 238 par rapport à la lignée *Astral*. Une analyse transcriptomique des gènes du métabolisme carboné et une analyse des flux métaboliques pour ces deux lignées de lin pourraient

permettre de mieux comprendre les raisons de ces modifications pour la lignée présentant le plus d'huile et accumulant le plus de saccharose et de fructose.

Bien qu'un blocage des carbones au niveau du fructose puisse indiquer partiellement une faible teneur en huile observée dans la lignée 238, d'autres facteurs pourraient contribuer à cette faible accumulation d'huile. En effet, les mutants décrits précédemment (Lonien et Schwender, 2009) et ayant un phénotype "huile" accumulent plus de protéines que le témoin. Par ailleurs, les travaux effectués par Zuk et ses collaborateurs en 2012 ont montré qu'une cosuppression de la chalcone synthase dans les graines de lin engendrait une accumulation de plus d'huile et de composés phénoliques dans ces graines mutées. La quantification de ces composés dans nos graines de lin pourrait permettre de cibler les redirections éventuelles de synthèse dans ces graines.

### **1.2.3. Teneur en protéines dans les graines de lin sélectionnées.**

L'analyse statistique effectuée sur les teneurs en composés de nos deux lignées a montré que la lignée présentant le plus d'huile (*Astral*), présente statistiquement ( $p < 0,001$ ) moins de protéines solubles ( $15,8 \pm 0,8$  g/100gMS) que la lignée 238 ( $22 \pm 2$  g/100gMS). La teneur plus élevée de protéines dans les graines présentant moins d'huile pourrait s'expliquer par une synthèse plus importante de protéines solubles au détriment de la synthèse des acides gras.

Des résultats similaires ont été notés lors de l'analyse biochimique de mutants d'*Arabidopsis thaliana* affectés au niveau des gènes codant pour des facteurs de transcription de type *wri1* et connus pour réguler la morphogénèse des graines (Lonien et Schwender, 2009), pour le rapport huile/protéines et de mutants de gènes codant pour des enzymes de la glycolyse cytosolique et plastidiale tel que la pyruvate kinase (Lonien et Schwender, 2009). Les auteurs suggéraient qu'une synthèse plus importante des protéines au détriment de la quantité d'huile était due soit à une absorption moins importante de saccharose et un flux de carbone moins important au niveau de la glycolyse plastidiale, soit à une absorption plus importante d'acides aminés ou encore à une activité du cycle de Krebs plus importante, nécessaire à la synthèse des acides aminés et des protéines.

### 1.2.4. Teneurs en polyphénols dans les graines de lin sélectionnées.

L'analyse statistique effectuée sur les teneurs en composés des deux lignées a montré que la lignée présentant le plus d'huile (*Astral*), présente statistiquement ( $p < 0,001$ ) moins de polyphénols ( $0,72 \pm 0,02$  g/100g MS) que la lignée 238 ( $0,90 \pm 0,09$  g/100g MS). Les travaux de Zuk et ses collaborateurs en 2012 ont montré que lors d'une cosuppression de la chalcone synthase dans les graines de lin, les graines présentaient des teneurs en huile et en composés phénoliques (proanthocyanidines) plus élevées et associées à un changement de la couleur du tégument passant de translucide (témoin) à marron (le cosupprimé). Cependant, le réactif de folin Ciocalteu utilisé pour le dosage des polyphénols peut interagir avec d'autres molécules telles que, des acides aminés aromatiques, des composés réduits pendant la réaction tels que des vitamines, des composés azotés (hydroxylamine, guanidine) et autres thiols, induisant un biais dans les résultats. L'analyse en HPLC-MS (QTOF) a permis d'identifier les principaux composés phénoliques présents dans les graines entières des deux cultivars étudiés. Le composé majoritaire est le sécoisolaricirésinol di-glucoside (SDG), lignane caractéristique des graines de lin (Lamblin *et al.*, 2008 ; Attoumbré *et al.*, 2010). Les trois autres composés identifiés sont des acides phénoliques : l'acide p-coumarique, l'acide férullique, l'acide vanillique et l'acide caféique.

L'analyse statistique (**Tableau IX**) effectuée sur les teneurs en composés des deux lignées a montré que la lignée présentant le plus d'huile (*Astral*), présente statistiquement ( $p < 0,05$ ) plus de SDG ( $827 \pm 4$  mg/100gMS) que la lignée 238 ( $600 \pm 20$  mg/100gMS) et statistiquement ( $p < 0,01$ ) moins d'acide vanillique ( $0,5 \pm 0,1$  mg/100g MS) que la lignée 238 ( $1,4 \pm 0,3$  mg/100g MS).

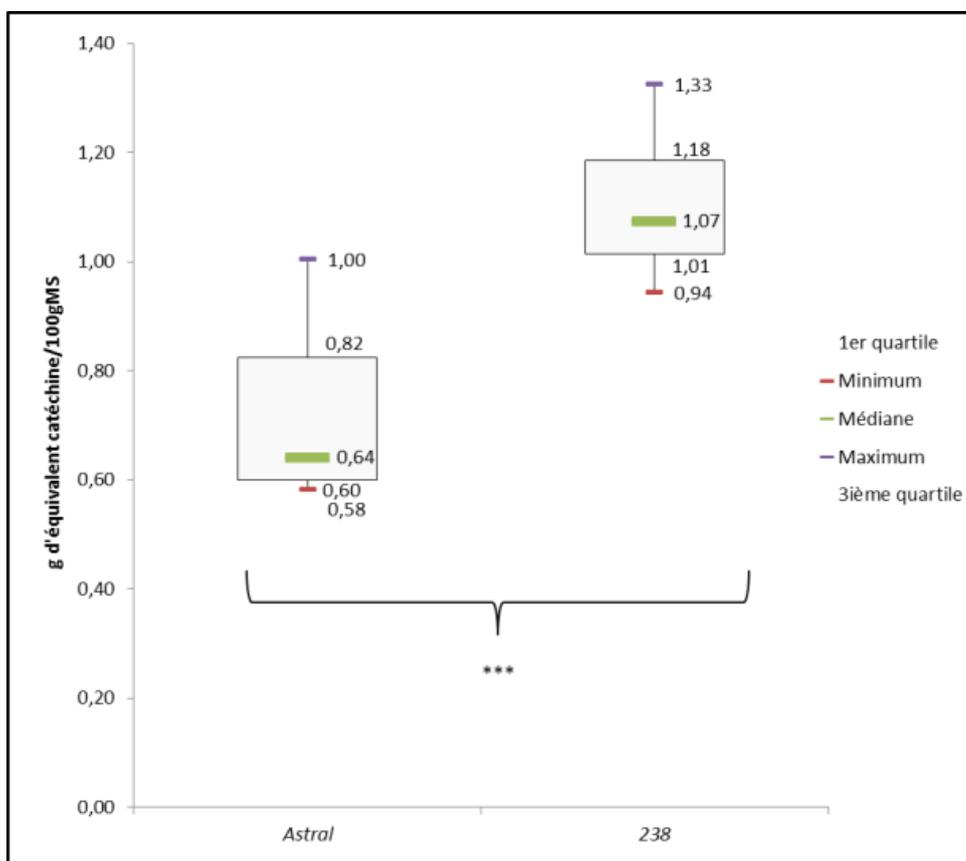
**Tableau IX : Teneurs des composés phénoliques dans les graines matures de lin *Astral* et 238.**

L'analyse statistique a été effectuée sur 3 répétitions biologiques. 20 graines matures pour chacune des 5 plantations différentes effectuées entre le 15 octobre 2011 et le 30 janvier 2014. MS : matière sèche. ML : matière lyophilisée. EC : écart-type.  $p > 0,05$  : NS ;  $p < 0,05$  : \* ;  $p < 0,01$  : \*\* ;  $p < 0,001$  : \*\*\*.

	SDG *		Acide p-coumarique NS		Acide vanillique**		Acide caféique NS		Acide férullique NS	
	mg/100g	EC	mg/100g	EC	mg/100g	EC	mg/100g	EC	mg/100g	EC
<b>238</b>	600	20	33	5	1,4	0,3	19	3	100	40
<b>Astral</b>	827	4	32,5	0,4	0,5	0,1	22	3	100	60

L'analyse statistique des teneurs en acide p\_coumarique, acide caféique et acide férulique dans les graines des deux lignées de lin n'a pas montré de différence significative.

La méthode d'extraction, utilisée pour obtenir ces résultats de polyphénols, ne permet pas d'extraire l'ensemble des polyphénols présents dans les graines. En effet, le catéchine et les polymères de catéchine tels que les proanthocyanidines ne sont pas extraits avec la méthode utilisée. Il a été montré que la déficience de proanthocyanidines dans les graines pouvait altérer la couleur du tégument des graines (Lepiniec *et al.*, 2006 ; Zuk *et al.*, 2012).



**Figure 41 : Teneur en proanthocyanidines en g d'équivalent de catéchine pour 100 g MS.**

L'analyse statistique a été effectuée sur 3 répétitions biologiques. Les cultures de ces plantes ont été effectuées entre le 15 octobre 2011 et le 30 janvier 2014. MS : matière sèche. ML : matière lyophilisée. EC : écart-type.  $p > 0.05$  : NS ;  $p < 0.05$  : \* ;  $p < 0.01$  : \*\* ;  $p < 0.001$  : \*\*\*.

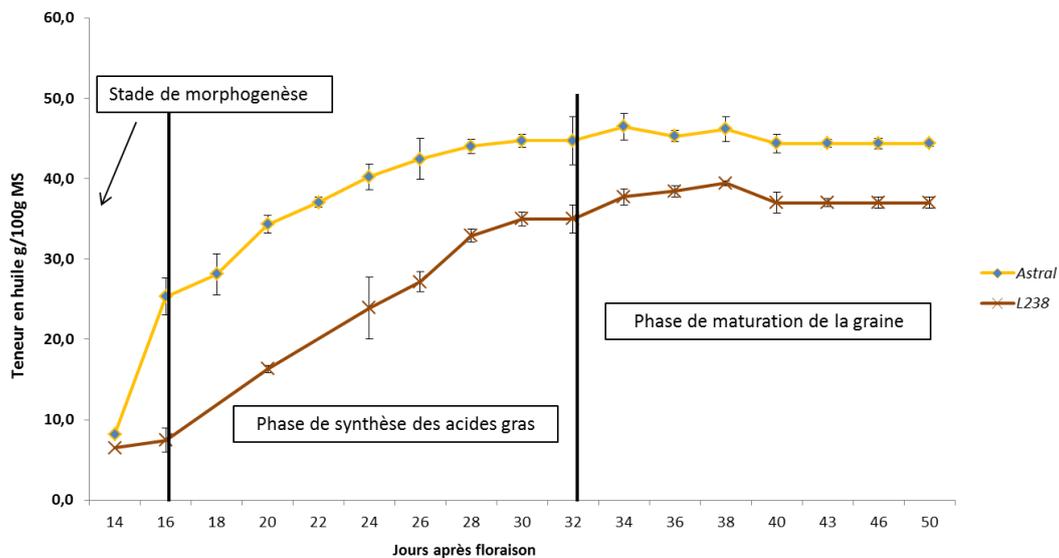
Les teneurs en proanthocyanidine (**Figure 41**) obtenues sont statistiquement ( $p < 0,001$ ) plus importantes dans les graines de lin marron (238) que dans la lignée jaune *Astral*. Ces résultats sembleraient indiquer une relation inverse entre la synthèse de ces composés et la synthèse d'huile dans ces deux lignées. Ce résultat suggérerait qu'un flux de

carbone plus important se ferait pour la synthèse de ces composés au détriment de la synthèse des acides gras. Ce résultat est toutefois contradictoire avec ceux publiés par Zuk *et al.* en 2012. En effet, dans leurs travaux, la cosuppression de la chalcone synthase dans les graines avait engendré une production plus importante de proanthocyanidines et d'huile avec plus d'acides gras insaturés. Comme la synthèse des proanthocyanidines utilise aussi du malonyl-CoA via l'action de la chalcone synthase, une compétition de ce substrat pourrait être observée limitant la synthèse des huiles. Cette hypothèse serait à vérifier dans les graines de lin 238. Il serait aussi intéressant de vérifier l'expression des gènes codant pour les voies de biosynthèse des polyphénols dans les deux lignées sélectionnées.

### 1.3. Synthèse des huiles et des acides gras dans les graines matures de lin.

#### 1.3.1. Synthèse des huiles et des acides gras.

L'évolution de la teneur en huile au cours du temps a été suivie de 14 jours après floraison (JAF) à graine mature (50 JAF) dans les graines des lignées *Astral* et 238 (Figure 42).



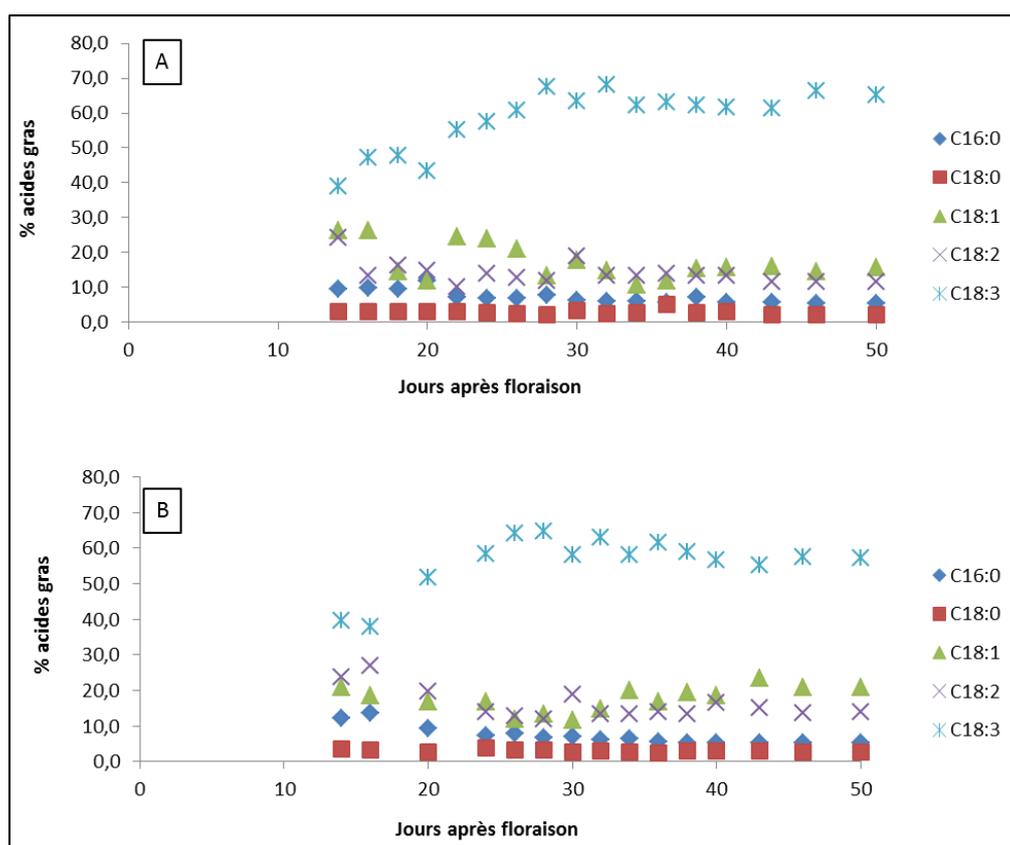
**Figure 42 : Teneur en huile dans les différentes lignées de lin au cours du développement.**

Pour chaque point de cinétique, 3 répétitions biologiques ont été effectuées pour la lignée *Astral* soit 68 mesures au total. Pour la lignée 238, les mesures aux stades 18 JAF et 22 JAF n'ont pu être effectuées. Analyse statistique (Test de Student) réalisée sur les données pour les deux populations *Astral* et 238 :  $p < 0,001$ .

Dans les graines de lin, l'accumulation des lipides s'effectuent en trois phases distinctes. La première phase correspond à l'initiation des synthèses et le début de la croissance de l'embryon allant de 1 à 10-14 JAF suivie d'une phase exponentielle de synthèses (16 à 32 JAF) où l'accumulation et les vitesses de synthèses des composés de

réerves sont très importantes. Cette phase correspond à la phase où l'apport en substrats carbonés par le phloème est couplée à une activité photosynthétique importante dans l'embryon (Troufflard, 2004). La troisième phase dite de maturation des graines s'effectue à partir de 32 JAF où la teneur en composés de réserves se stabilise et la dessiccation de la graine s'effectue. Après analyse statistique (Test de Student) de l'ensemble des données pour *Astral* et 238, une différence significative ( $p < 0,001$ ) au niveau de la production d'huile a pu être mise en évidence entre les deux lignées. Ceci pourrait être du à un flux de carbone moins important pour la synthèse des huiles dans les graines de la lignée 238 par rapport à *Astral*. Cependant, pour la lignée 238, présentant une date précoce et une durée très courte de floraison (**Figure 36**), nous n'avons pas enregistré de répercussion sur la durée de synthèses des composés de réserves (**Figure 42**).

A chaque stade de développement des lignées *Astral* et 238, des esters méthyliques d'acides gras ont été préparés et leur composition déterminée par GC-MS (**Figure 43**).



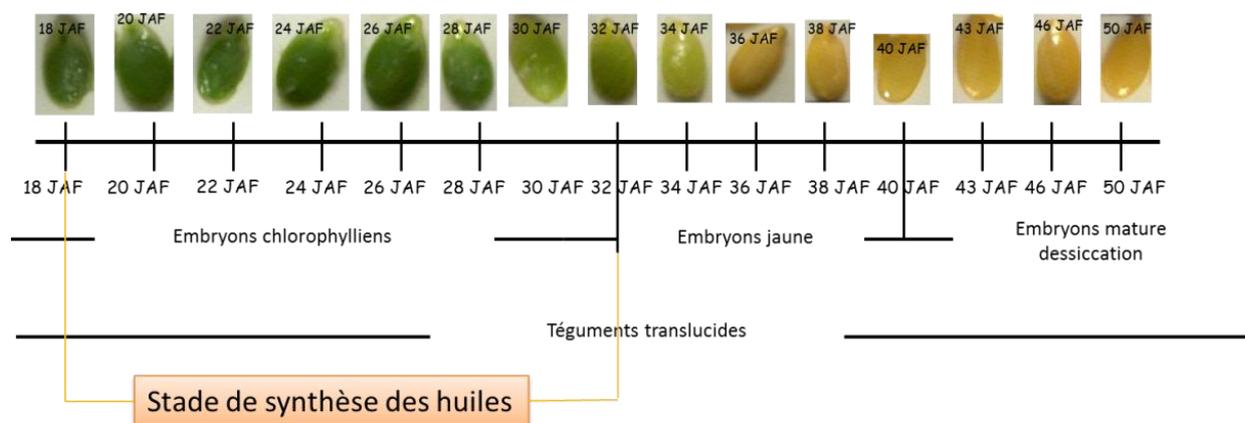
**Figure 43 : Accumulation des acides gras (%) dans les graines de lin *Astral* et 238.**

A : *Astral* ; B : 238. Pour chaque point de cinétique, 3 répétitions biologiques ont été effectuées pour la lignée *Astral* soit 68 mesures au total. Pour la lignée 238, les mesures aux stades 18 JAF et 22 JAF n'ont pu être effectuées.

Chez les lignées *Astral* et 238, les teneurs en C18:3 augmentent au cours du temps corrélée à une diminution des teneurs en C16:0, C18:2 et C18:1 et ceci jusque 28 JAF. La teneur en C18:0 est très faible et sa diminution n'est pas très importante passant de 3,1 % à 2,1 % entre 16 JAF et 50 JAF dans les graines de la lignée *Astral*. Le profil en acides gras est similaire et évolue de manière identique entre les deux lignées alors que ces deux plantes n'accumulent pas la même quantité d'huile. Les mécanismes d'accumulation des huiles semblent donc perturbés dans les graines de la lignée 238 par rapport à *Astral* indépendamment du type d'acides gras synthétisés.

### 1.3.2. Modification de la couleur du tégument.

Lors de la phase de synthèse des lipides (16 JAF à 32 JAF), la couleur du tégument de la lignée *Astral* reste translucide (**Figure 44**). Les embryons sont verts jusqu'à 32 JAF. Les embryons deviennent jaune à partir de 32 JAF. Ces résultats sembleraient indiquer qu'une activité photosynthétique active assurerait la synthèse des composés de réserves dans les embryons de la lignée *Astral*.

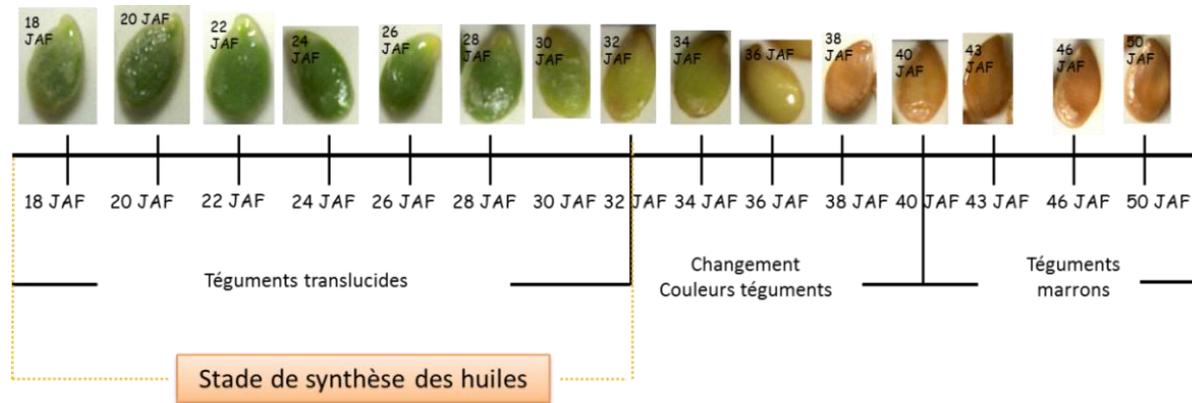


**Figure 44 : Evolution de la couleur du tégument et des embryons chez les graines de la lignée *Astral* de 18 JAF à graine mature.**

Pour chaque point de cinétique, 3 observations visuelles (3 répétitions biologiques) ont été effectuées.

Pour la lignée 238, les embryons restent vert et la couleur du tégument de la lignée 238 reste translucide jusque 30 JAF (**Figure 45**). Un début de brunissement du tégument est observé de 32 JAF à 36 JAF. C'est lors du début de la phase de maturation que le tégument de la lignée 238 acquiert sa couleur brune foncée caractéristique de sa graine mature. L'initiation de la couleur brune débute donc vers la fin de la synthèse des lipides.

Or, les composés impliqués dans la couleur de la graine (flavonoïdes, proanthocyanidines) ont comme précurseurs métaboliques le malonyl-CoA qui est le précurseur majoritaire impliqué dans la synthèse des différents acides gras.



**Figure 45 : Evolution de la couleur du tégument et de l'embryon chez les graines de la lignée 238 de 18 JAF à graine mature.**

Pour chaque point de cinétique, 3 observations visuelles (3 répétitions biologiques) ont été effectuées.

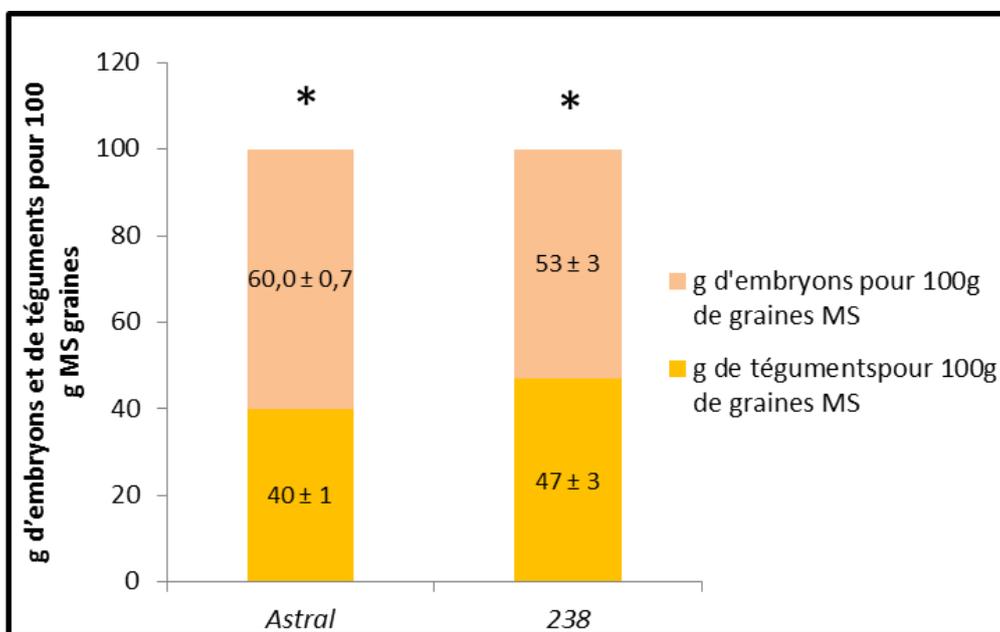
Il semblerait que la lignée présentant le moins d'huile (238) ait subi une redirection du flux de carbone vers la synthèse de ces composés secondaires au détriment de la synthèse des huiles. Un tel comportement pourrait expliquer cette teneur en huile plus faible chez 238. Toutefois les teneurs en proanthocyanidines sont faibles et le changement de couleur s'effectue à la fin du stade de la synthèse des acides gras. Il serait toutefois important d'évaluer l'expression des gènes codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse de ces composés durant la synthèse des acides gras.

#### **1.4. Localisation et synthèse des composés dans les graines de lin.**

Les graines de lin sont composées de deux tissus, l'embryon et le tégument. L'étude de la localisation de ces composés dans ces tissus et des lieux de synthèse de ces composés permettrait de mieux comprendre les interactions possibles entre ces composés. Pour cela, les différents composés de réserves ont été systématiquement quantifiés dans les téguments et les embryons des graines matures et au cours du développement des embryons.

#### 1.4.1. Poids des téguments et des embryons des graines de lin.

Les études menées sur les téguments et les embryons des graines de lin des deux lignées sélectionnées (**Figure 46**) ont montré des poids de téguments et d'embryons significativement différents ( $p < 0.05$ ).



**Figure 46 : Proportion d'embryons et de téguments dans les graines de lin matures**

L'analyse statistique a été effectuée sur 100 graines matures provenant de 5 plantations (20 graines par plantation). Les cultures de ces plantes ont été effectuées entre le 15 octobre 2011 et le 30 janvier 2014.  $p > 0,05$  : NS ;  $p < 0,05$  : \* ;  $p < 0,01$  : \*\* ;  $p < 0,001$  : \*\*\*. MS : matière sèche.

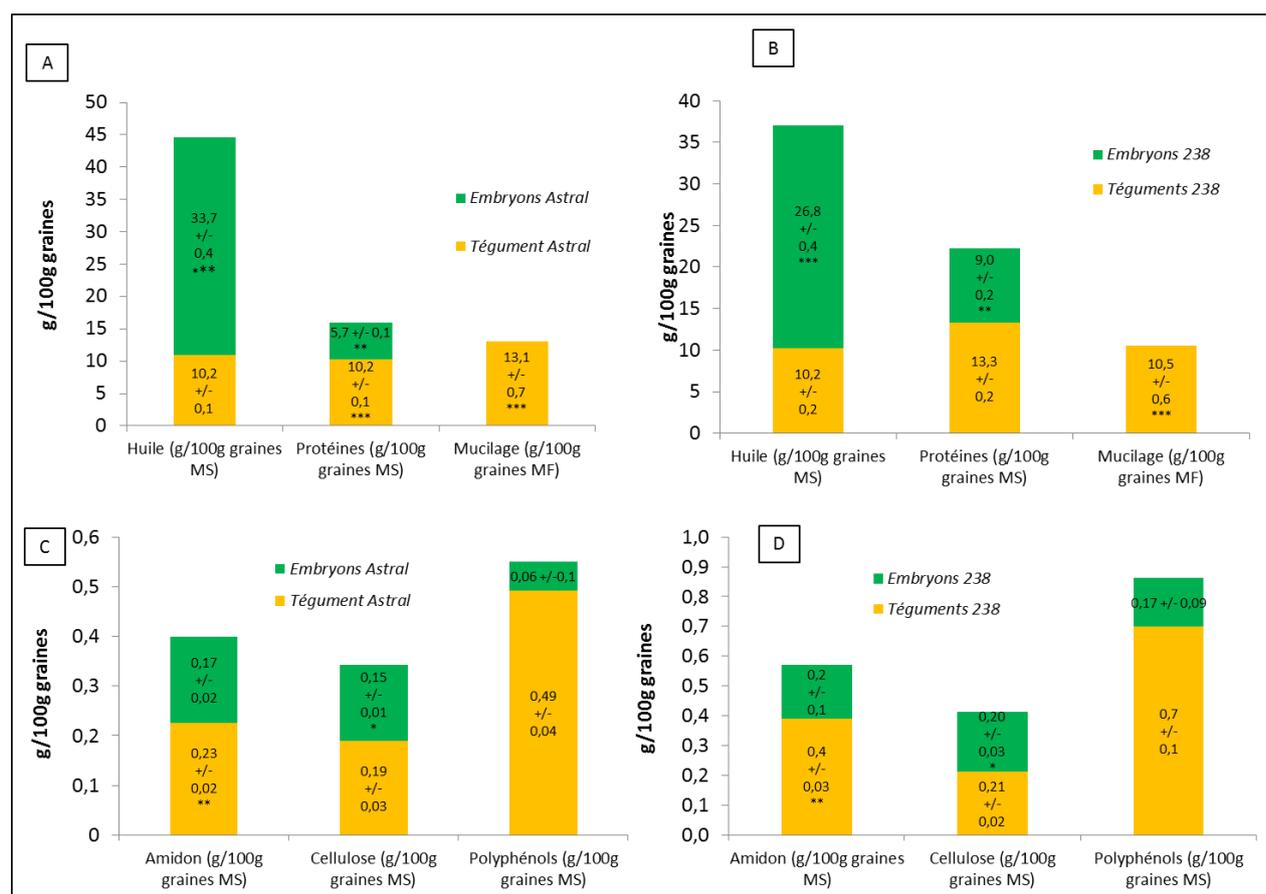
En effet, la lignée *Astral* présentant le plus d'huile présente un poids d'embryons 7 % plus élevé ( $60,0 \pm 0,7$  g/100g MS comparé à  $53 \pm 3$  g/100g MS chez 238) et un poids de tégument 7 % plus faible ( $40 \pm 1$  g/100g MS comparé à  $47 \pm 3$  g/100g MS chez 238) que ceux observés dans la lignée 238. Ces résultats sembleraient suggérer une répartition différente entre les composés synthétisés dans l'embryon et les téguments et dépendant probablement des génotypes de lin. Afin d'analyser concrètement les composés synthétisés dans ces deux tissus, il est nécessaire de connaître et quantifier tous les composés accumulés.

#### 1.4.2. Localisation des composés de réserves.

Le composé majoritaire accumulé dans les graines de lin est l'huile localisée dans les embryons (75,5 % de l'huile totale pour *Astral*) (**Figure 47 C et D**). L'amidon et la cellulose sont localisés dans l'embryon et dans le tégument à environ 50 % (**Figure 47**). Par contre, les

polyphénols, le mucilage et les protéines sont présents majoritairement au niveau des téguments (89 % polyphénols dans les téguments *Astral* et 82 % pour 238) (**Figure 47 A et B**). Cette répartition est semblable aux données de la littérature (Oomah, 2003 ; Acket *et al.*, 2011 ; Venglat *et al.*, 2011). Bien que les deux lignées de lin présentent une répartition similaire de ces composés de réserves dans leurs téguments et dans leurs embryons, des différences de teneurs ont cependant pu être notées (**Figure 47**).

La lignée de lin (*Astral*) présentant le plus d'huile dans ses graines, ne présente pas de différence significative en teneur d'huile dans les téguments des graines matures par comparaison avec la lignée 238 (**Figure 47 A et B** ;  $10,2 \pm 0,1$  g/100g MS et  $10,2 \pm 0,2$  g/100g MS respectivement pour *Astral* et 238). La différence de la teneur en huile entre *Astral* et 238 n'est observée qu'au niveau de l'embryon, où l'embryon *Astral* accumule 1,25 fois plus d'huile que celui de la lignée 238.



**Figure 47 : Répartition des composés de réserves dans les graines de lin, dans les embryons et les téguments**

A : Répartition des huiles, protéines et mucilage dans les graines d'*Astral* ; B : Répartition des huiles, protéines, mucilage dans les graines de la lignée 238 ; C : Répartition de l'amidon, cellulose, polyphénols dans les graines d'*Astral* ; D : Répartition de l'amidon, cellulose, polyphénols dans les graines de la lignée 238. L'analyse statistique a été effectuée sur 3 répétitions biologiques. Les cultures de ces plantes ont été effectuées entre le 15 octobre 2011 et le 30 janvier 2014.

La lignée *Astral* qui présente plus d'huile et moins de protéines solubles dans ses graines que la lignée 238, présente statistiquement ( $p < 0,001$ ) moins de protéines solubles dans les téguments et dans les embryons (**Figure 47**). En effet, dans les embryons, les teneurs en protéines solubles sont statistiquement ( $p < 0,001$ ) moins importantes chez *Astral* ( $5,7 \pm 0,1$  g de protéines dans l'embryon pour 100 g MS) que dans les embryons de lin 238 ( $9,0 \pm 0,2$  g de protéines dans l'embryon pour 100 g MS). Ces résultats sembleraient indiquer une réorientation des synthèses dans les embryons de lin vers la synthèse des protéines au détriment de la synthèse des lipides pour la lignée 238.

La lignée *Astral* présentant 1,25 fois moins de polyphénols dans les graines matures de lin que les graines de lin la lignée 238, présente également moins de polyphénols dans les téguments (1,51 fois moins) mais des quantités similaires dans les embryons de lin ( $0,15$  g/100g MS) (**Figure 47**). Les teneurs en amidon dans les téguments des graines de lin 238 sont 1,70 fois plus importantes que dans les téguments de lin *Astral* (**Figure 47 A et B**). Par contre, on remarque que la quantité de mucilage dans les téguments des graines de lin 238 est 1,24 fois moins importante que celle observée dans la lignée *Astral* (**Figure 47 A et B**). Le mucilage étant constitué de différents sucres, on pourrait penser qu'il existe une relation entre la teneur en amidon et la teneur en mucilage dans les téguments de graines de lin. Les travaux effectués par Windsor *et al.* (2000) dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* a montré que des globules d'amidon sont présents dans le cytoplasme des deux couches de cellules du tégument externe (oi1 et oi2) avant la synthèse du mucilage. Ces amyloplastés s'élargissent et se multiplient jusqu'au stade embryon torpille. C'est à ce stade que les cellules de la couche cellulaire du tégument externe oi2 commencent à produire du mucilage (Windsor *et al.*, 2000). Ces travaux ont également montré que les amyloplastés disparaissent durant la production du mucilage et que de nombreuses enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des sucres simples (rhamnose synthase) sont présentes. La présence de ces enzymes pourrait indiquer une conversion de l'amidon en glucose pour la synthèse du mucilage. Des données similaires ont été obtenues dans les téguments des graines de lin (Acket *et al.*, 2011). La présence de 1,24 fois moins de mucilage dans les graines matures de la lignée 238 par rapport à *Astral* pourrait s'expliquer par une limitation de la conversion de l'amidon en glucose, substrat nécessaire à la synthèse du mucilage,

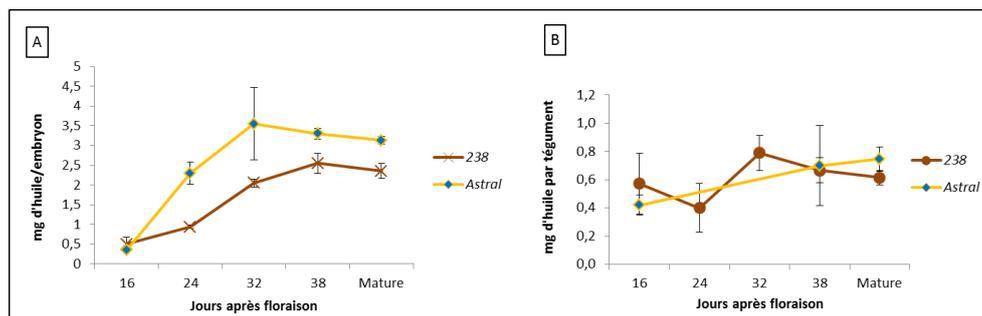
puisque 1,70 fois plus d'amidon dans les téguments matures de la lignée 238 par rapport à *Astral* ont été enregistrés (**Figure 47 A et B**).

Afin d'effectuer les cinétiques de synthèse des composés de réserves dans les embryons et les téguments et compte tenu de la nécessité de récolter des quantités importantes de matériel pour la réalisation de ces mesures, uniquement 4 points de cinétiques ont été choisis. Les points ont été retenus à des dates stratégiques dans l'accumulation des huiles :

- 16 JAF : Début de la synthèse des huiles.
- 24 JAF : Phase exponentielle de la synthèse des huiles.
- 32 JAF : Fin de synthèse des huiles et début du changement de la couleur des téguments de la lignée 238.
- 38 JAF : Fin du changement de la couleur des téguments de la lignée 238.

#### **1.4.3. Evolution de la teneur en huile dans les embryons et les téguments.**

Afin de définir dans quel tissu s'effectue majoritairement la synthèse d'huile, les teneurs en huiles ont été quantifiées à 16, 24, 32, 38 et à 50 JAF (graine mature) dans les téguments et les embryons de nos deux lignées de lin. L'analyse des teneurs en huile dans les embryons des deux lignées de lin a montré une augmentation des teneurs en huile entre 16 JAF (*Astral* :  $0,35 \pm 0,03$  mg d'huile par embryon ; 238 :  $0,5 \pm 0,2$  mg d'huile par embryon) à 32 JAF (*Astral* :  $3,3 \pm 0,1$  mg d'huile par embryon ; 238 :  $2,5 \pm 0,3$  mg d'huile par embryon) (**Figure 48 A**).



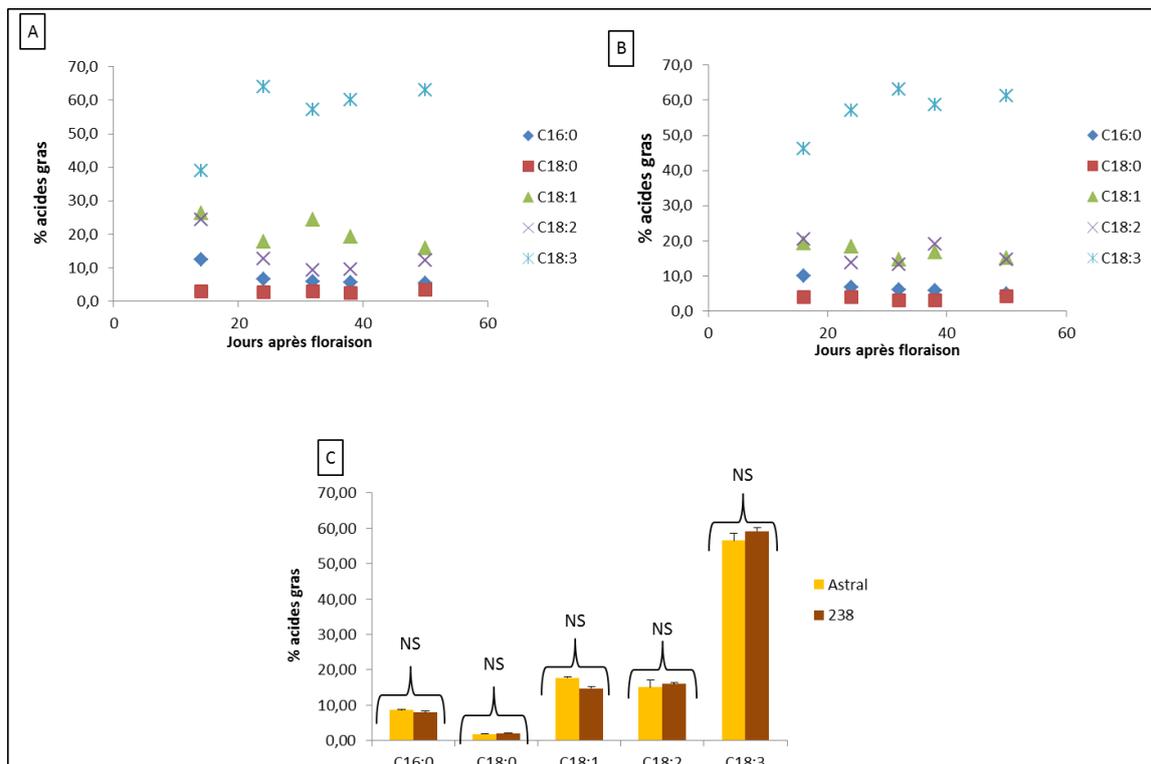
**Figure 48 : Evolution de la quantité d'huile au cours du développement de la graine.**

A : Embryons de lin  
B : Téguments de lin

Pour chaque point de cinétique, 3 répétitions biologiques ont été effectuées pour la lignée *Astral* et 238 soit 15 mesures au total. Pour la lignée *Astral*, les mesures aux stades 24 JAF et 32 JAF dans les téguments n'ont pu être effectuées. Analyse statistique (Test de Student) réalisée sur les données pour les deux populations *Astral* et 238 :  $p < 0,01$ .

L'analyse statistique réalisée sur l'ensemble de teneurs en huile dans les embryons de lin *Astral* et 238 indique une différence significative ( $p < 0,05$ ) au niveau de la production d'huile entre ces deux lignées. La lignée *Astral* accumule plus d'huile entre 16 et 32 JAF dans ses embryons que la lignée 238 (**Figure 48 A**). Les teneurs en huile dans les téguments sont faibles à 16 JAF (238 :  $0,6 \pm 0,2$  mg d'huile par tégument) et n'évoluent pas (238, Stade mature :  $0,62 \pm 0,05$  mg d'huile par tégument) (**Figure 48 B**). Ces résultats montrent donc que l'accumulation des lipides s'effectue spécifiquement dans les embryons pour les deux lignées et que les différences observées au niveau des graines entières se vérifient dans les embryons.

Le profil en acides gras dans les embryons des deux lignées de lin a été déterminée dans des embryons et des téguments âgés de à 16, 32, 38 et 50 JAF (**Figure 49 A et B**). L'évolution du profil en acide gras dans les embryons des deux lignées de lin a montré, comme pour les graines entières, une augmentation de la teneur en C18:3 entre 16 et 24 JAF corrélée à une diminution des teneurs en C16:0, C18:2 et C18:1 et ceci jusque 24 JAF.



**Figure 49 : Teneurs en acides gras dans les embryons et les téguments de lin.**

A : Evolution de la teneur en acides gras dans les embryons de la lignée *Astral*.

B : Evolution de la teneur en acides gras dans les embryons de la lignée 238.

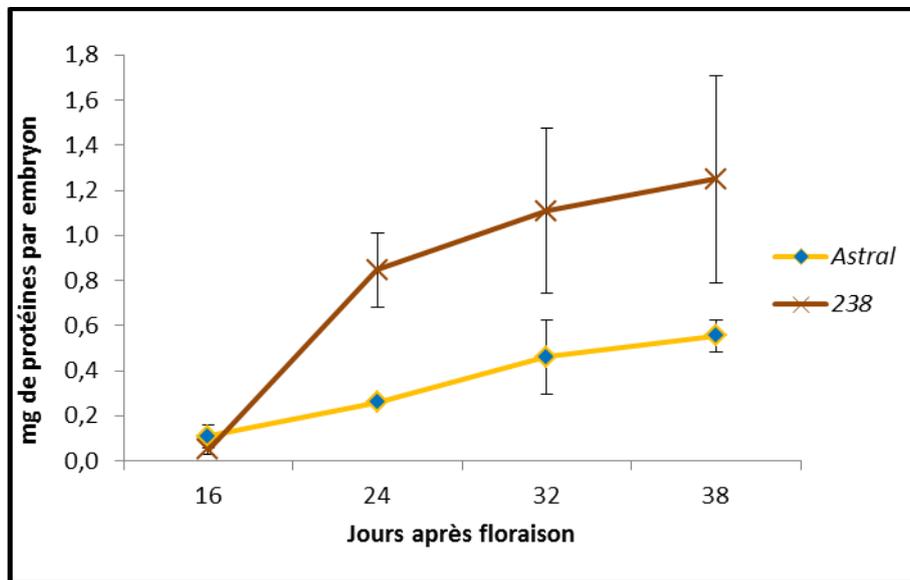
C : Profil en acides gras dans les téguments matures des graines des lignées *Astral* et 238.

Pour chaque point de cinétique, 3 répétitions biologiques ont été effectuées pour la lignée *Astral* et 238 soit 15 mesures au total. Analyse statistique (Test de Student) réalisée sur les données pour les deux populations *Astral* et 238 :  $p > 0,05$ .

Dans les téguments des graines *Astral* et 238, les teneurs en acides gras n'évoluent pas et les synthèses sont égales à 0 (**Figure 49 C**). Ces résultats confortent le fait que la différence d'accumulation d'huile observée entre les deux lignées de lin est indépendante de la synthèse des acides gras et est réalisée spécifiquement au sein des embryons.

#### **1.4.4. Synthèse des protéines au cours du développement des embryons de lin.**

Les teneurs en protéines dans les embryons des deux lignées de lin ont été suivies de 16 à 38 jours après floraison (**Figure 50**). Pour chaque point de cinétique, 3 répétitions biologiques ont été effectuées et une analyse statistique de Student a été réalisée sur l'ensemble des points de la lignée *Astral* et 238.



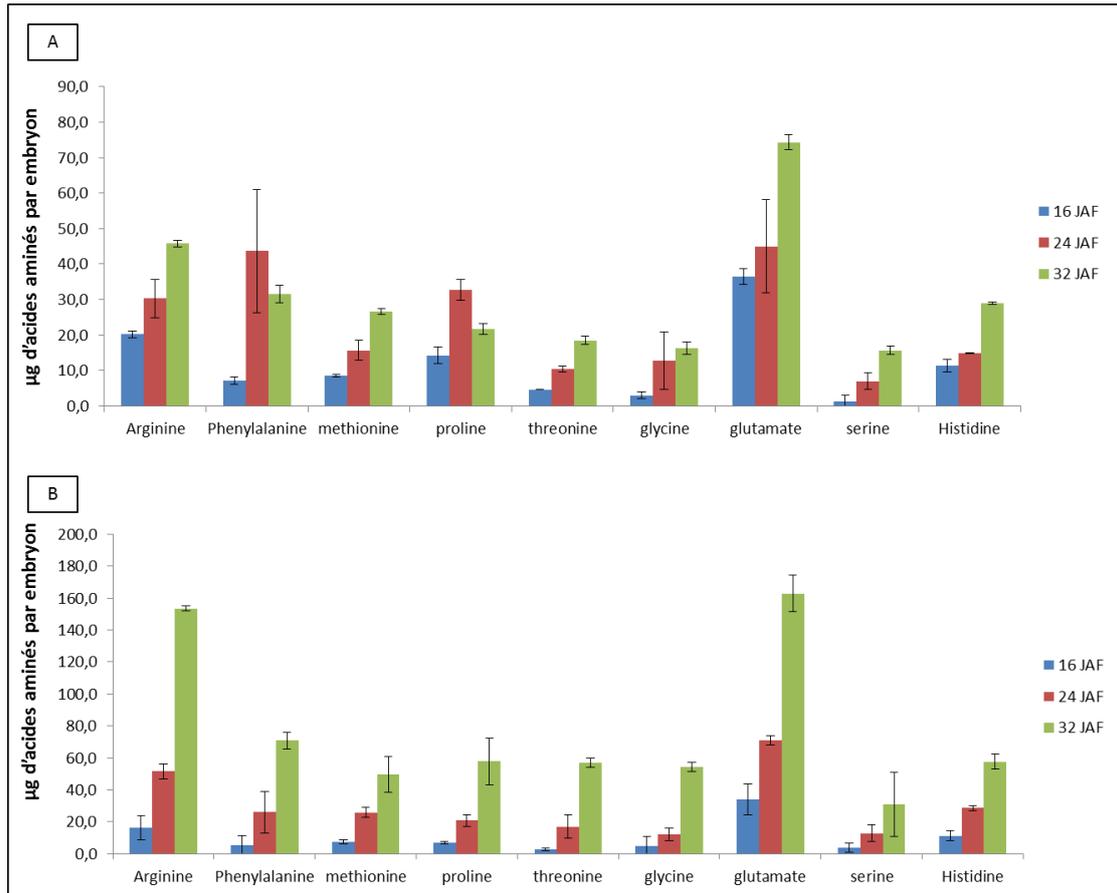
**Figure 50 : Accumulation des protéines au cours de l'embryogenèse.**

Pour chaque point de cinétique, 3 mesures biologiques ont été effectuées pour les lignées *Astral* et 238 soit 12 mesures au total. Analyse statistique (Test de Student) réalisée sur les données pour les deux populations *Astral* et 238 :  $p < 0,05$ .

Une augmentation de la teneur en protéines durant la synthèse des acides gras entre 16 JAF (*Astral* :  $0,11 \pm 0,05$  mg de protéines par embryon ; 238 :  $0,05 \pm 0,02$  mg de protéines par embryon) et 32 JAF (*Astral* :  $0,5 \pm 0,2$  mg de protéines par embryon ; 238 :  $1,1 \pm 0,4$  mg de protéines par embryon à 32 JAF) a été observée pour les deux lignées de lin. Une différence significative ( $p < 0,05$ ) de l'accumulation des protéines entre les deux lignées de lin a pu être mise en évidence (test de Student). Les embryons de la lignée 238 accumulent plus de protéines entre 16 et 32 JAF que les embryons de la lignée *Astral*. Ces résultats montrent que les embryons de lin accumulent moins d'huile accumulent plus de protéines durant la phase de synthèse des réserves.

### 1.4.5. Synthèse des acides aminés au cours du développement des embryons de lin.

Les teneurs en acides aminés des protéines solubles des embryons de lin ont été déterminées à 16 JAF, 24 JAF, 32 JAF dans les embryons des lignées *Astral* et 238 (Figure 51). La quantification a pu être effectuée pour l'arginine, la phénylalanine, la méthionine, la proline, la thréonine, la glycine, l'acide glutamique, la sérine et l'histidine.



**Figure 51 : Evolution de la teneur en acides aminés dans les embryons de lin**

A : *Astral* ; B : 238.

Pour chaque point de cinétique, 3 répétitions biologiques ont été effectuées pour les lignées *Astral* et 238 soit 9 mesures au total. Analyse statistique (Test de Student) réalisée sur les données pour les deux populations *Astral* et 238 :  $p < 0,05$  pour les teneurs en arginine, méthionine, glutamate et histidine.

Les résultats ont montré une augmentation de la teneur de ces acides aminés dans les embryons des deux lignées de lin entre 16, 24 et 32 JAF, excepté pour la proline et la phénylalanine dans les embryons *Astral*. En effet, dans les embryons de la lignée *Astral* la teneur en phénylalanine augmente de 16 JAF ( $7 \pm 1$  µg par embryon) jusqu'à 24 JAF ( $44 \pm 20$  µg par embryon) et reste stable à 32 JAF ( $32 \pm 3$  µg par embryon) alors que dans les embryons de

lin 238, la teneur en phénylalanine augmente de 16 JAF ( $5\pm 6$   $\mu\text{g}$  par embryon) à 32 JAF ( $71\pm 5$   $\mu\text{g}$  par embryon). La teneur en proline dans les embryons de lin *Astral* augmente de 16 JAF ( $14\pm 2$   $\mu\text{g}$  par embryon) à 24 JAF ( $33\pm 3$   $\mu\text{g}$  par embryon) et diminue de 24 JAF à 32 JAF ( $22\pm 2$   $\mu\text{g}$  par embryon) alors que dans les embryons de lin 238, la teneur en proline augmente de 16 JAF ( $6,8\pm 0,9$   $\mu\text{g}$  par embryon) à 32 JAF ( $58\pm 10$   $\mu\text{g}$  par embryon).

Toutefois l'analyse statistique (Test de Student) effectuée sur l'ensemble des répétitions biologiques effectuées à 16, 24, 32 JAF entre les deux populations *Astral* et 238 n'a pas montré de différences significatives d'accumulation en acides aminés. L'analyse statistique a toutefois révélé une différence d'accumulation dans les embryons de lin *Astral* et 238 uniquement pour l'arginine ( $p < 0,05$ ), la méthionine ( $p < 0,05$ ), l'acide glutamique ( $p < 0,05$ ) et l'histidine ( $p < 0,05$ ) entre 16 et 32 JAF.

Les teneurs, à 16 JAF, en arginine (*Astral* :  $20,2\pm 0,9$   $\mu\text{g}$  par embryon; 238 :  $16\pm 8$   $\mu\text{g}$  par embryon), en méthionine (*Astral* :  $8,6\pm 0,4$   $\mu\text{g}$  par embryon ; 238 :  $7\pm 1$   $\mu\text{g}$  par embryon), en acide glutamique (*Astral* :  $36\pm 2$   $\mu\text{g}$  par embryon ; 238 :  $34\pm 10$   $\mu\text{g}$  par embryon), et en histidine (*Astral* :  $11\pm 2$   $\mu\text{g}$  par embryon ; 238 :  $11\pm 3$   $\mu\text{g}$  par embryon) sont similaires entre les deux lignées. Les teneurs à 32 JAF en arginine (238 :  $153\pm 2$   $\mu\text{g}$  par embryon), en méthionine (238 :  $49\pm 11$   $\mu\text{g}$  par embryon), en acide glutamique (238 :  $163\pm 11$   $\mu\text{g}$  par embryon) et en histidine (238 :  $58\pm 5$   $\mu\text{g}$  par embryon) sont supérieures dans les embryons de la lignée 238 par rapport aux teneurs de ces acides aminés dans les embryons de la lignée *Astral* (arginine *Astral* :  $45,8\pm 0,9$   $\mu\text{g}$  par embryon ; en méthionine *Astral* :  $26,7\pm 0,9$   $\mu\text{g}$  par embryon ; en acide glutamique *Astral* :  $74\pm 2$   $\mu\text{g}$  par embryon ; et en histidine *Astral* :  $29,0\pm 0,3$   $\mu\text{g}$  par embryon). Ces résultats montrent une différence d'accumulation de ces acides aminés dans les embryons des deux lignées de lin.

L'histidine est synthétisée à partir du ribose-5-phosphate, un intermédiaire de la voie des pentoses phosphates (Berg *et al.*, 2013). L'accumulation plus importante de l'histidine dans les embryons de la lignée 238 pourrait indiquer une utilisation plus importante du ribose-5-phosphate pour la synthèse de ce composé au détriment de la synthèse de la voie oxydative des pentoses phosphates. Or, l'analyse des flux métaboliques dans les embryons de maïs a montré que la voie oxydative des pentoses phosphates est la voie principale pour la synthèse des cofacteurs nécessaires à la synthèse des acides gras (Alonso *et al.*, 2010). Une

analyse des flux métaboliques dans les embryons des deux lignées de lin sera effectuée pour déterminer si la voie oxydative des pentoses phosphates est une voie majoritaire pour la synthèse des cofacteurs nécessaire à la synthèse des acides gras.

La méthionine est synthétisée à partir du 3-phosphoglycérate et à partir de l'oxaloacétate (Berg *et al.*, 2013). L'accumulation plus importante de la méthionine dans les embryons de la lignée 238 entre 16 et 32 JAF semblerait indiquer une redirection du flux de carbone pour la synthèse de ce composé au niveau du 3-phosphoglycérate et de l'oxaloacétate au détriment de la synthèse des acides gras.

L'acide glutamique et l'arginine sont synthétisés à partir de la glutamine importés de l'albumen (Berg *et al.*, 2013). Ces acides aminés sont les acides aminés les plus abondants dans les protéines des graines de lin (Morris, 2007). La glutamine peut également contribuer à la synthèse des acides gras. En effet, les travaux effectués par Alonso *et al.*, 2010 ont montré que les unités acétyl-CoA d'acides gras sont enrichies en carbone 13 après culture d'embryons de maïs en présence de [U-13C<sub>5</sub>]-glutamine. La teneur plus importante de ces deux acides aminés dans les embryons de lin 238 pourrait montrer une synthèse plus importante de ces acides aminés au détriment de la synthèse des acides gras à partir de la glutamine. Des incubations d'embryons de lin en présence de [U-13C<sub>5</sub> glutamine] seront effectuées pour définir la participation de la glutamine à la synthèse des acides gras dans les embryons de lin et montrer si des différences significatives d'enrichissement pourraient être observées dans les embryons des deux lignées de lin.

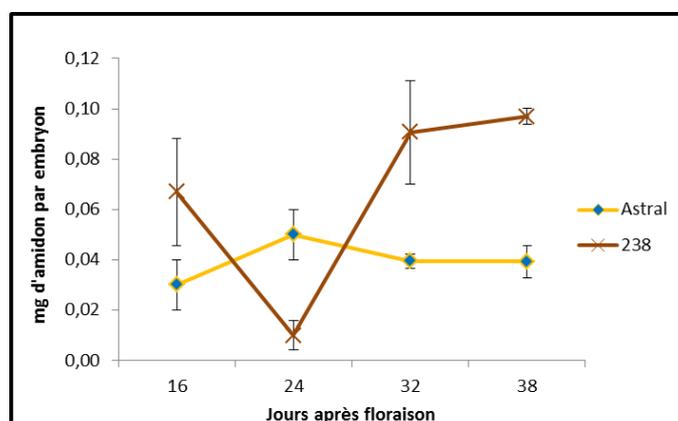
#### **1.4.6. Synthèse de l'amidon au cours du développement des embryons de lin.**

Dans les embryons de lin, les teneurs en amidon sont très faibles (< 1g/100g MS). La quantification de l'amidon a été effectuée à 16, 24, 32, 38 JAF (**Figure 52**).

Pour chaque point de cinétique, 3 répétitions biologiques ont été effectuées et une analyse statistique de Student réalisée sur l'ensemble des points des lignées *Astral* et 238.

L'analyse a montré une diminution de la teneur en amidon entre 16 JAF (0,07±0,02 mg d'amidon par embryon) et 24 JAF (0,01±0,01 mg d'amidon par embryon), puis une augmentation entre 24 JAF et 32 JAF (0,09±0,02 mg d'amidon par embryon) pour la lignée 238. La lignée *Astral* présente un comportement différent puisque la teneur en amidon diminue entre 16 JAF (0,03±0,01 mg d'amidon par embryon) et 24 JAF (0,05±0,01 mg

d'amidon par embryon). Sa teneur en amidon n'évolue plus à partir de 24 JAF. L'analyse statistique réalisée sur l'ensemble des données pour les populations *Astral* et 238 n'a pas montré de différence significative.



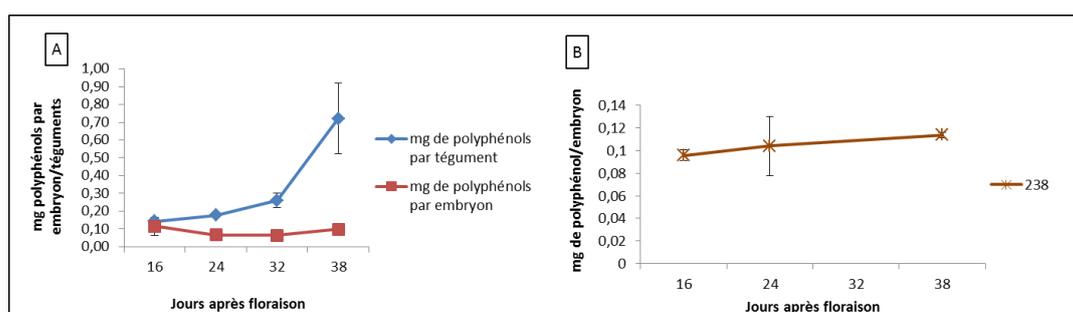
**Figure 52 : Evolution de la teneur en amidon dans les embryons de lin.**

Pour chaque point de cinétique, 3 répétitions biologiques ont été effectuées pour les lignées *Astral* et 238 soit 12 mesures au total. Analyse statistique (Test de Student) réalisée sur les données pour les deux populations *Astral* et 238 :  $p > 0,05$ .

#### 1.4.7. Polyphénols dans les graines de lin.

##### 1.4.7.1. Synthèse des polyphénols au cours du développement de la graine.

La teneur en polyphénols dans les embryons de lin n'évolue pas au cours du temps (Figure 53). La synthèse de ces composés s'effectue donc exclusivement au niveau du tégument.



**Figure 53 : Evolution de la quantité de polyphénols dans les graines de lin.**

A : Teneur en polyphénols dans les embrons et les téguments des graines de lin *Astral*.

B : Teneur en polyphénols dans les embryons des graines de lin 238.

Pour chaque point de cinétique, 3 répétitions biologiques ont été effectuées pour les lignées *Astral* et 238 soit 12 mesures au total. Analyse statistique (Test de Student) réalisée sur les données pour les deux populations *Astral* et 238 :  $p > 0,05$ .

L'évolution des teneurs en polyphénols dans les téguments de lin *Astral* est très faible en début de phase de synthèse des huiles (16 JAF et 24 JAF) alors qu'elle est plus importante durant la période 32-38 JAF.

1.4.7.2. Polyphénols dans les embryons matures de lin.

Après dosage des polyphénols totaux dans les embryons matures, les composés phénoliques se sont révélés être présents en très faible quantité (< 1 mg /100g embryons). Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les deux lignées de lin étudiées (**Figure 53**). L'identification des polyphénols dans les embryons de lin par HRLC-MS (ESI-QTOF) indique la présence de 4 polyphénols majoritaires (SDG, le 3,4 dihydrobenzoïque, l'acide p-coumarique, l'acide caféique et l'acide vanillique.

Les teneurs calculées et présentées dans le **Tableau X** indiquent que pour la lignée *Astral*, l'acide phénolique majoritaire est l'acide caféique alors que l'acide vanillique est majoritaire pour la lignée 238.

**Tableau X : Teneurs des composés phénoliques dans les embryons de graines matures des lignées *Astral* et 238 exprimées en mg/100g de MS.**

	SDG NS		3,4- Dihydroxybenzoïque NS		Acide p- coumarique **		Acide caféique *		Acide vanillique ***	
	mg/100g	EC	mg/100g	EC	mg/100g	EC	mg/100g	EC	mg/100g	EC
<b>238</b>	0,01	0,01	0,4	0,2	0,09	0,06	0,6	0,2	0,6	0,4
<b><i>Astral</i></b>	0,01	0,01	0,2	0,1	0,35	0,06	1,4	0,4	0,08	0,02

L'analyse statistique a été effectuée sur 3 répétitions biologiques. Abréviations : MS : matière sèche. ML : matière lyophilisée. p>0.05 : NS ; p<0.05 : \* ; p<0.01 : \*\* ; p< 0.001 : \*\*\*.

Dans nos expériences, le lignane sécoisolaricirésinol, répertorié comme étant le plus abondant dans la graine entière, n'est présent dans l'embryon qu'à l'état de traces. La lignée de lin *Astral* accumulant le plus d'huile dans son embryon, présente 2,17 fois plus d'acide caféique (p<0,05) et 3,89 fois plus d'acide p-coumarique (p<0,01), mais 6,88 fois moins d'acide vanillique (p<0,05) que les embryons de lin 238. Les teneurs en sécoisolaricirésinol et en 3,4 dihydroxybenzoïque sont similaires dans les embryons de lin.

1.4.7.3. Polyphénols dans les téguments de graines matures de lin.

Plusieurs travaux bibliographiques mentionnent que la synthèse et la localisation des lignanes se faisaient dans les téguments de la graine de lin (Hano *et al.*, 2006 ; Attoumbré *et al.*, 2010). Les dosages effectués en HRLC-MS (ESI-TOF) au laboratoire ont permis de vérifier que les téguments étaient les tissus où les plus grandes quantités de lignane (SDG) et d'acides phénoliques sont retrouvées et jusqu'à 500 fois plus que dans les embryons (**Tableau X et XI**).

Les téguments des graines de lin accumulent majoritairement du SDG, et minoritairement de l'acide férullique, de l'acide p-coumarique, de l'acide cafféique et de l'acide vanillique (**Tableau XI**).

**Tableau XI : Teneurs des composés phénoliques dans les téguments des graines de lin matures des lignées *Astral* et 238 exprimées en mg pour 100g téguments**

	SDG **		Acide p-coumarique NS		Acide caféique NS		Acide férullique ***		Acide vanillique ***	
	mg/100g	EC	mg/100g	EC	mg/100g	EC	mg/100g	EC	mg/100g	EC
<b>238</b>	500	70	31	4	16	5	97	11	1,8	0,4
<b><i>Astral</i></b>	730	10	31	5	13	3	160	30	0,5	0,1

L'analyse statistique a été effectuée sur 3 répétitions biologiques. Abréviations : MS : matière sèche. ML : matière lyophilisée.  $p > 0.05$  : NS ;  $p < 0.05$  : \* ;  $p < 0.01$  : \*\* ;  $p < 0.001$  : \*\*\*.

La lignée *Astral* accumulant le plus d'huile dans ses embryons, présentent des teneurs statistiquement ( $p < 0,01$ ) plus importantes en SDG, et en acide férullique avec respectivement  $730 \pm 10$  mg/100g et  $160 \pm 30$  mg/100g comparés à  $500 \pm 70$  mg/100g et  $97 \pm 11$  mg/100g pour la lignée 238. Par contre, la lignée *Astral* produit 3,6 fois moins d'acide vanillique ( $p < 0,01$ ) dans ses téguments par rapport à la quantité accumulée dans les téguments de la lignée 238 (**Tableau X**). Ce résultat semblerait indiquer une relation entre la teneur en huile et la teneur de ces composés.

### **1.5. Bilan des analyses biochimiques des graines des deux lignées de lin.**

Les caractérisations biochimiques des graines, des téguments et des embryons de lin au cours de l'embryogenèse ont permis de mettre en évidence une synthèse des huiles exclusivement dans les embryons de lin entre 16 et 32 JAF. La lignée *Astral* accumulant plus d'huile dans ses graines que la lignée 238 présente des vitesses de synthèse d'huile plus importantes que la lignée 238. La synthèse d'huile plus faible dans les graines de la lignée 238 pourrait être due à une disponibilité réduite des précurseurs (pyruvate, phosphoénolpyruvate) nécessaires à leur synthèse et/ou à la redirection du flux de carbone vers la synthèse d'autres composés au détriment de cette synthèse d'huile.

Dans les embryons d'autres plantes oléagineuses, il a été mentionné que le glucose, le fructose, le saccharose importés des téguments sont métabolisés par les réactions de la glycolyse pour produire les précurseurs nécessaires à la synthèse des lipides (Schwender *et al.*, 2003 ; Schwender *et al.*, 2004 ; Kim et Zambryski, 2005 ; Allen *et al.*, 2009 ; Alonso *et al.*,

2010). Or, la quantification de ces sucres libres dans les graines matures de nos deux lignées de lin a montré que les graines de lin 238 présentent des teneurs plus élevées en fructose et en saccharose que celles des graines de lin *Astral*. Ces données sembleraient indiquer une défaillance de la conversion de ces sucres en acides gras par des enzymes de la glycolyse. Des résultats similaires ont été observés lors des analyses biochimiques et des flux métaboliques dans des mutants d'*Arabidopsis thaliana* affectés au niveau des gènes contrôlant l'expression des enzymes de la glycolyse cytosolique et plastidiale (Lonien et Schwender, 2009).

Les analyses biochimiques ont également montré que durant la phase de synthèse des lipides, entre 16 et 32 JAF, les protéines et l'amidon sont également synthétisés dans les embryons de lin. La lignée *Astral* produisant le plus d'huile dans ses graines matures, accumule moins de protéines que celles observées dans les graines de la lignée 238. Les analyses biochimiques ont révélé une synthèse de protéines moins importante dans les embryons de la lignée *Astral* que dans les embryons de la lignée 238. L'analyse des teneurs des acides aminés de ces protéines a montré que les synthèses d'histidine, d'acide glutamique, d'arginine et de méthionine sont significativement plus importantes dans les embryons de la lignée 238 que dans les embryons de la lignée *Astral* entre 16 et 32 JAF. L'histidine est synthétisée à partir du ribose 5 phosphate, l'acide glutamique et l'arginine à partir de la glutamine et de la méthionine à partir de l'oxaloacétate. La synthèse plus importante de ces acides aminés dans la lignée 238 semblerait indiquer une redirection du flux de carbone à partir du ribose 5 phosphate, de la glutamine, du 3-phosphoglycérate et de l'oxaloacétate nécessaires à la synthèse des acides aminés et donc des protéines au détriment de la synthèse des acides gras, au niveau de l'embryon. Les carbones permettant la synthèse de ces composés proviennent du glucose et/ou de la glutamine. Il serait donc particulièrement intéressant de définir l'origine des carbones de ces molécules par des études d'enrichissements isotopiques.

La lignée *Astral* produisant le plus d'huile dans ses embryons présente des teneurs plus faibles en polyphénols et en proanthocyanidines dans ses téguments. La synthèse des polyphénols et des proanthocyanidines nécessitent des précurseurs carbonés (phénylalanine, tyrosine) synthétisés à partir de glucose/fructose/saccharose et/ou de glutamine. Il se pourrait que le glucose/fructose/saccharose et la glutamine présente dans

les téguments permettraient la synthèse de ces composés au détriment de leurs importations dans l'albumen puis dans l'embryon pour la synthèse de composés tels que les lipides dans l'embryon. Des relations entre les synthèses faites au niveau du tégument et des embryons pourraient être établies entre la teneur en huile et la teneur en polyphénols et plus précisément en proanthocyanidines dans les téguments de lin. En effet, ces composés sont exclusivement synthétisés dans les téguments des graines de lin, durant la phase de synthèse des acides gras. Une défaillance au niveau des transporteurs de sucres/glutamine des téguments vers l'embryon ou une défaillance au niveau des enzymes des voies de biosynthèse des polyphénols/proanthocyanidines pourrait expliquer cette hypothèse.

L'analyse biochimique des graines matures des lignées de lin a également montré que la lignée accumulant le plus d'huile (*Astral*) accumule également plus de mucilage et moins d'amidon que les graines de la lignée 238. Les travaux effectués par Windsor *et al.* en 2000 dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* a montré que des globules d'amidon sont présents dans le cytoplasme des deux couches de cellules du tégument externe (oi1 et oi2) avant la synthèse du mucilage et disparaissent au cours de la synthèse du mucilage. Or, dans les téguments de nombreuses enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des sucres simples (rhamnose synthase) sont présentes suggérant une dégradation de l'amidon en glucose puis une conversion du glucose en d'autres sucres pour la synthèse du mucilage. La teneur plus élevée de mucilage dans les graines de lin *Astral* pourrait donc être expliquée par une efficacité plus importante de la conversion d'amidon en glucose, nécessaire à la synthèse du mucilage. Il serait particulièrement intéressant d'identifier si des gènes codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse du mucilage et de la dégradation de l'amidon sont différenciellement exprimés dans les téguments des graines des deux lignées de lin.

Pour mieux comprendre l'ensemble des résultats obtenus, une analyse transcriptomique a été effectuée sur les embryons et les téguments des deux lignées de lin à 16, 24, 32, 38 JAF. Cette étude nous servira à cibler les gènes différenciellement exprimés entre *Astral* et 238 et qui pourraient expliquer les différences d'accumulation et de synthèse dans les embryons et les téguments des deux lignées de lin étudiées.

## **CHAPITRE 2 : ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES DES EMBRYONS ET DES TÉGUMENTS DES LIGNÉES DE LIN *ASTRAL* ET 238 AU COURS DE L'EMBRYOGENESE.**

Les analyses biochimiques effectuées dans les embryons et les téguments des deux lignées de lin (*Astral* et 238) ont montré des différences significatives d'accumulation de composés. En effet, une accumulation plus importante d'huile et de cellulose dans les embryons de la lignée *Astral* par rapport aux embryons de la lignée 238 a été mise en évidence. De plus, une accumulation plus importante de mucilage et de SDG dans les téguments de la lignée *Astral* a été également mise en évidence. Les teneurs en proanthocyanidines et en protéines sont plus importantes dans les téguments de la lignée 238. Les teneurs en protéines dans les embryons de la lignée 238 sont plus élevées que dans les embryons de la lignée *Astral*. L'accumulation différente de ces composés dans les embryons et les téguments de ces deux lignées de lin pourrait être due à l'expression différente de gènes codant pour des enzymes clés impliquées dans les voies de biosynthèse de ces composés et/ou à une expression différente de certains facteurs de transcription. Afin de cibler les différences d'expression des gènes codant pour ces enzymes et leurs implications dans la synthèse des huiles, une analyse transcriptomique par la technologie des puces à ADN, a été effectuée dans les téguments et les embryons des deux lignées de lin à différents stades clés (16 JAF, 24 JAF, 32 JAF, 38 JAF) de la synthèse des réserves comme décrits dans la partie **Résultats et Discussions-Chapitre 1**.

Pour cela, des puces spécifiques «lin» ont été utilisées pour analyser le transcriptome des deux lignées de lin aux différents stades de développement. Ces puces ont été fabriquées par la société Roche-Nimblegen et comprennent 46 589 contigs de 60 mers en 4 copies et qui ont été sélectionnées à partir d'une collection de 59 000 contigs (Fenart *et al.*, 2010 ; Fenart *et al.*, 2013). Pour chaque point de cinétique, 2 répétitions biologiques et 2 répétitions techniques ont été réalisées. Après scan des puces, normalisation des données, élimination des artefacts et ajustement de l'ensemble des intensités mesurées, l'identification des gènes différentiellement exprimés entre la lignée *Astral* et 238 a été effectuée en réalisant un test statistique SAM avec un delta de 2 (**Chapitre Matériels et Méthodes 2.3**). Pour les gènes différentiellement exprimés entre les deux conditions, la moyenne des répétitions biologiques et techniques a été calculée. Les différences entre *Astral* et 238 pour un  $\log_2\text{ratio} +2/-2$  ont été utilisées pour faire la discrimination entre les expressions.

### 2.1. Analyse globale des résultats de transcriptomique.

Dans un premier temps, l'expression de gènes dans les téguments et les embryons des graines de lin a été analysée globalement entre *Astral* et 238 pour les différents stades de développement, 16 JAF, 24 JAF, 32 JAF, 38 JAF et dans les deux tissus (téguments, embryons) analysés précédemment. Une analyse statistique SAM « Significance Analysis for Microarray » avec un delta de 2 a été réalisée (Chapitre Matériels et Méthodes ; **Tableau XII**).

**Tableau XII : Nombre de gènes putatifs différentiellement exprimés entre les lignées *Astral* et 238 dans les téguments et les embryons à 16 JAF, 24 JAF, 32 JAF et 38 JAF.**

Stade de développement	Expression	Téguments Nombre d'EST	Embryons Nombre d'EST
16 JAF	Sur-exprimés <i>Astral/238</i>	102	0
	Pas de différence d'expression	46 449	46 589
	Sous-exprimés <i>Astral/238</i>	38	0
24 JAF	Sur-exprimés <i>Astral/238</i>	1274	1250
	Pas de différence d'expression	45 141	44 996
	Sous-exprimés <i>Astral/238</i>	174	343
32 JAF	Sur-exprimés <i>Astral/238</i>	0	12
	Pas de différence d'expression	46 589	46 566
	Sous-exprimés <i>Astral/238</i>	0	11
38 JAF	Sur-exprimés <i>Astral/238</i>	2	273
	Pas de différence d'expression	46 583	46 186
	Sous-exprimés <i>Astral/238</i>	4	130

Analyse statistique SAM avec un delta de 2 (sous-exprimés  $\log_2 \text{ratio} \leq -2$  et surexprimés  $\log_2 (\text{ratio}) \geq +2$ ).

Cette première analyse a montré que le nombre d'ESTs différentiellement exprimés entre *Astral* et 238 est plus important au stade 24 JAF (1 593 ESTs différentiellement exprimés) qu'aux stades 32 JAF (12 ESTs différentiellement exprimés) et 38 JAF (403 ESTs différentiellement exprimés) dans les embryons (**Tableau XII**). L'analyse réalisée au niveau des téguments a également montré que les ESTs les plus différentiellement exprimés entre les deux lignées le sont au stade 24 JAF (1 448 ESTs différentiellement exprimés) plutôt qu'aux stades 16 JAF (140 ESTs différentiellement exprimés) et 38 JAF (6 ESTs différentiellement exprimés).

Dans nos expériences, l'expression des gènes dans les embryons à 16 JAF et dans les téguments à 32 JAF n'est pas reproductible entre les deux répétitions biologiques. Ces deux essais n'ont donc pas été étudiés. D'après cette première analyse générale, l'expression des gènes entre les deux lignées de lin accumulant des quantités différentes de composés dans les embryons et les téguments semblent se traduire par une expression de gènes très différente au stade 24 JAF. Étant donné que les phases d'accumulation et de synthèse des acides gras, des protéines, des polyphénols et des mucilages ont été ciblées à 24 JAF (**Résultats et Discussions- Chapitre 1, Figure 42 ; Figure 50 ; Figure 53**) et que les ESTs exprimés sont plus importants à ce stade, une étude plus approfondie a été réalisée à ce stade.

D'autre part, il a été répertorié dans la littérature que les gènes codant pour les enzymes des voies de biosynthèse de ces composés ainsi que les ESTs codant pour les facteurs de transcription contrôlant l'expression de ces gènes sont particulièrement exprimés au stade torpille (Venglat *et al.*, 2011). Dans les travaux présentés, nous nous sommes intéressés à l'analyse de l'expression de gènes dans les embryons et les téguments de lin âgés de 24 JAF.

## **2.2. Expression des gènes dans les téguments de lin âgés de 24 JAF.**

L'analyse statistique de l'expression des gènes dans les téguments de lin *Astral* et 238 à 24 DAF a montré que 1 448 ESTs sont différentiellement exprimés sur les 46 589 ESTs soit 3 % des gènes présents sur les puces à oligonucléotides du lin. Sur ces 1 448 ESTs différentiellement exprimés entre *Astral* et 238, 1 274 sont surexprimés dans les téguments de lin *Astral* et 174 sont sous exprimés par rapport aux téguments de la lignée 238. Seuls, 398 ESTs des 1 448 exprimés différemment présentent une fonction putative, soit 27 % des ESTs. Parmi les 398 contigs annotés et différentiellement exprimés entre les deux lignées, seuls, les gènes codant pour les enzymes de la synthèse de la paroi végétale, ceux impliqués dans sa modification, dans les voies de biosynthèse des proanthocyanidines, dans le métabolisme carboné primaire et secondaire ainsi que les facteurs de transcription ont été répertoriés et suivis afin de mieux comprendre pourquoi le poids des téguments, les teneurs en polyphénols/proanthocyanidines et en protéines sont différents dans les téguments des deux lignées sélectionnées.

### **2.2.1. Gènes différentiellement exprimés et codant pour des enzymes de la biosynthèse de la paroi végétale.**

Les parois végétales sont très abondantes dans les téguments des graines de lin (Morris, 2007). Une différence de teneurs de ces composés pourrait expliquer pourquoi le poids du tégument de la lignée 238 est plus important que le poids du tégument de la lignée *Astral*. C'est pourquoi l'analyse de l'expression des gènes codant pour des enzymes de la biosynthèse des parois a été appréhendée.

L'analyse des ESTs annotés pour appartenir aux groupes fonctionnels de la modification de la paroi cellulaire, a montré que 10 gènes putatifs sont différentiellement exprimés (Tableau XIII).

**Tableau XIII : Différence d'expression des gènes putatifs impliqués dans la biosynthèse de la paroi cellulaire dans les téguments de lin *Astral* et 238 à 24 JAF.**

GENE ID	Log2ratio	Description des gènes putatifs
genolin_c24137 184	2,75	pectin méthylesterase (pme3)
genolin_c22036 371	2,61	Caffeoyl-CoA 3-O-méthyltransférase
genolin_c45971 212	2,53	Glucosyltransférase
genolin_c13922 211	2,01	UDP-glucose déhydrogénase
genolin_c21175 630	2,00	Secondary cell wall-related glycosyltransférase famille 14
genolin_c17518 549	-2,00	Endo-1,4-beta-glucanase
genolin_c26492 285	-2,01	Secondary cell wall-related glycosyltransférase famille 14
genolin_c1510 778	-2,17	Cellulose synthase
genolin_c31895 293	-2,33	Cellulose synthase
genolin_c18432 413	-3,16	Cellulose synthase

Log2 ratio a été calculé comme intensité de signal dans *Astral* vs 238. Les gènes surexprimés dans les téguments d'*Astral* par rapport à 238 à 24 JAF (log2ratio>2) sont représentés en rouge. Les gènes surexprimés dans les téguments 238 par rapport à *Astral* à 24 JAF (log2ratio>-2) sont représentés en vert.

L'étude de ces 10 gènes putatifs différentiellement exprimés permettrait de comprendre pourquoi le poids des téguments et les teneurs polyphénols/proanthocyanidines sont plus élevées dans les graines de la lignée 238 par rapport à celles de la lignée *Astral*. Ainsi, les gènes les plus exprimés dans les téguments des graines de lin accumulant le moins d'huile (lignée 238) codent pour des celluloses synthases (genolin\_c1510 778 ; genolin\_c31895 293 ; genolin\_c18432 413), pour une endo-1,4-beta-glucanase (genolin\_c17518 549), des glycosyltransférases de la famille 14 (genolin-C26492285) et de la famille 47 (genolin-C38101263). Par contre, les gènes surexprimés dans les téguments de la lignée *Astral* codent pour une pectine méthylestérase

(genolin\_c24137 184), une glucosyltransférase (genolin\_c45971 212), une cafféoyl -CoA 3-O-methyltransferase (genolin\_c22036 371), une glycosyltransférase de la famille 14 (genolin\_c21175 630), une UDP-glucose déshydrogénase (genolin\_c13922 211) et (**Tableau XIII**).

La sur-expression de l'EST codant pour une UDP-glucose déshydrogénase (genolin\_c13922 211) dans les téguments de la lignée *Astral* par rapport à la lignée 238 a été observée (**Tableau XIII**). L'UDP-glucose déshydrogénase est une enzyme permettant la synthèse de l'UDP-acide glucuronique à partir de l'UDP-glucose. Les pectines, composés majoritaires des parois des végétaux, sont constituées de sucres riches en acide galacturonique dérivant de l'UDP-acide glucuronique. La surexpression de l'UDP-glucose déshydrogénase dans les plantes de la luzerne (*Medicago sativa*) a conduit à une diminution de la matière sèche de la paroi végétale liée à une diminution de la concentration en polysaccharides dans les parois cellulaires de 6 % (Samac *et al.*, 2004). Les auteurs indiquent une disponibilité plus importante de l'acide UDP glucuronique pour la synthèse de xylose par la UDP-glucose A décarboxylase dans les plantes surexprimant ce gène (Samac *et al.*, 2004). La paroi végétale est composée majoritairement des téguments des graines (Morris, 2007) et une teneur différente pourrait contribuer à un poids différents des téguments.

Le poids plus faible des téguments (7 % de moins; **Résultats et Discussions- Chapitre 1, paragraphe 1.4.1.**) dans les graines de la lignée *Astral* par rapport à ceux de la lignée 238 pourrait s'expliquer par la surexpression de l'EST codant pour une UDP-glucose déshydrogénase (genolin\_c13922 211) dans les téguments de la lignée *Astral/238*, mais également par la différence d'expression des ESTs codant pour les celluloses synthases (genolin\_c1510 778 ; genolin\_c31895 293 ; genolin\_c18432 413) dans les téguments des deux lignées de lin (**Tableau XIII**).

En effet, des travaux réalisés par Burton *et al.* (2000) ont montré que l'extinction d'un gène codant pour une cellulose synthase dans *Nicotiana benthamiana* engendrait une réduction de 25 % du contenu en cellulose corrélée à une augmentation de la teneur en pectine (homogalacturonane). Les auteurs ont expliqué ce mécanisme par une disponibilité plus importante de glucose pour la synthèse des pectines au détriment des teneurs en

celluloses. Les mutants altérés au niveau des sous unités des celluloses synthases CESA2, CESA5, CESA9, présentent une diminution de la largeur de la paroi secondaire dans les téguments des cellules épidermiques des graines d'*Arabidopsis thaliana*. Cette altération est due non seulement à une diminution de la teneur en cellulose, mais également à une diminution de monosaccharides présents au niveau de la paroi (Stork *et al.*, 2010 ; Mendu *et al.*, 2011). Les auteurs admettent que les celluloses synthases jouent un rôle dans le renforcement de la paroi secondaire dans les cellules épidermiques des téguments des graines, entraînant une augmentation du poids des graines. Bien que le poids des graines des deux lignées de lin sélectionnées soit identique, le poids des téguments dans les graines de lin 238 est statistiquement plus important de 7 % (**Résultats et Discussions-Chapitre 1, Figure 46**).

Les parois végétales étant les composés majoritaires des téguments des graines de lin (Morris, 2007), la surexpression des celluloses synthases (genolin\_c1510 778 ; genolin\_c31895 293 ; genolin\_c18432 413) dans les téguments de la lignée 238 et *Astral* ainsi que la surexpression d'une UDP-glucose déshydrogénase (genolin\_c13922 211) dans les téguments de la lignée *Astral/238* pourraient engendrer une teneur différente de parois végétales dans les téguments des deux lignées de lin expliquant ainsi pourquoi le poids des téguments est plus élevé dans les téguments de la lignée 238/*Astral*. Cette observation pourrait aussi être corrélée à la surexpression de la glycosyltransférase (genolin\_c26492 285) dans les téguments de la lignée 238.

Les glycosyltransférases sont des enzymes connues pour avoir des rôles clés dans le processus de synthèse de la paroi primaire et secondaire et pouvant modifier le poids des téguments (Mendu *et al.*, 2011). En effet, l'analyse de mutants de glycosyltransférases de la famille 47 codant pour une xyloglucan  $\beta$ -1,2 galactosyltransférase a montré une absence de fucogalactosyl sur les chaînes de xyloglucanes induisant une réduction de la largeur de la paroi des hypocotyles (Madsen *et al.*, 2003 ; Ryden *et al.*, 2003 ; Scheible et Pauly, 2004). La surexpression de l'ESTs codant pour une glycosyltransférase de la famille 14 (genolin\_c26492 285) dans les téguments de la lignée 238 pourrait expliquer le poids plus important des téguments dans les graines de cette lignée (**Résultats et Discussions-Chapitre 1 ; paragraphe 1.4.1.**). Cependant, des ESTs codant pour des glycosyltransférases

(genolin\_c21175 630 ; genolin\_c45971 212) sont également surexprimés dans les téguments de la lignée *Astral*.

La synthèse des parois secondaires pourrait être amplifiée par la surexpression d'une endo-1,4  $\beta$ -glucanase (genolin\_c17518 549) dans les téguments des graines de lin 238. En effet, l'endo-1,4  $\beta$ -glucanase est une enzyme connue pour catalyser l'hydrolyse du  $\beta$ -glucosyl (1 $\rightarrow$ 4) en structures solubles, pouvant participer au remodelage de la paroi cellulaire à partir de ces structures  $\beta$ -glucosyl présentes au niveau des chaînes de xyloglucanes.

Les pectines méthylestérases appartiennent à une grande famille multigénique (66 isoformes chez *Arabidopsis thaliana*) et contrôlent le degré de méthylestérification (DM) de l'homogalacturonane (HG), un polymère linéaire constitué de molécules d'acide  $\alpha$ -D-galacturonique et constituant principal des pectines dans la paroi végétale. Cette enzyme est liée à la paroi végétale et sa fonction est de catalyser la dé-estérification de la pectine (Di Matteo *et al.*, 2005). Cette réaction induit une rigidification de la paroi *via* l'établissement de liaisons inter-chaînes impliquant une modification de la capacité d'élongation cellulaire (Pelloux *et al.*, 2007). La surexpression du gène codant pour une pectine méthylestérase (genolin\_c24137 184 ; **Tableau XIII**) dans les téguments des graines de lin *Astral* pourrait induire une modification de la structure de la paroi engendrant une réduction de la paroi expliquant pourquoi le poids des téguments de la lignée *Astral* est moins important que dans la lignée 238.

Dans les téguments des deux lignées de lin *Astral* et 238 âgés de 24 JAF, une surexpression de l'EST codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse des lignines/lignanes, la caffeoyl-CoA-3-O méthyltransférase (CCOMT; genolin\_c22036 371) a été observée. Cette enzyme permet la synthèse du féruloyle-CoA et de la S-adénosyl-L-homocystéine à partir de la S-adénosyl-L-méthionine et du caffeoyl-CoA. Des travaux ont montré que la forte dérégulation de la CCOMT par une construction antisens dans les peupliers, la luzerne et le tabac induisait une forte diminution des teneurs en lignine (de 12 à 50 %) dans les parois végétales des plantes transgéniques (Zhong *et al.*, 1998, 2000 ; Pinçon *et al.*, 2001 ; Guo *et al.*, 2001 ; Marita *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2013). La teneur en lignine n'a pas été quantifiée dans les graines de nos deux lignées sélectionnées, mais la

surexpression de cet EST (CCOMT; genolin\_c22036 371; **Tableau XIII**) dans les téguments de la lignée *Astral* pourrait induire une synthèse plus importante de lignine dans les parois des téguments de la lignée *Astral* que dans celles de la lignée 238. La surexpression de ce gène dans les téguments de la lignée *Astral* pourrait aussi être responsable d'une synthèse plus importante de SDG et d'acide férulique dans les téguments de cette lignée par rapport à la lignée 238. En effet, la caffeoyl-CoA-3-O méthyltransférase (CCOMT) étant une enzyme de la voie de biosynthèse des lignines, mais également des lignanes, sa surexpression pourrait expliquer la différence de teneurs de SDG observée dans les téguments des deux lignées de lin (**Résultats et Discussions-Chapitre 1, Tableau XI**).

La différence de couleur des téguments entre les deux lignées de lin pourrait également être expliquée par l'expression différentielle de cet EST. En effet, l'inhibition de l'expression de la CCOMT chez le peuplier a eu pour conséquence d'augmenter la fluorescence des parois cellulaires des vaisseaux du xylème par l'accumulation d'acide p-hydroxybenzoïque estérifié à la paroi cellulaire (Meyermans *et al.*, 2000). La teneur en acide hydroxybenzoïque n'a pas pu être déterminé dans les téguments de nos graines de lin, mais la différence de couleur pourrait être due à l'accumulation différentielle de proanthocyanidines observées dans les téguments de nos graines de lin (**Résultats et Discussions-Chapitre 1, Figure 41**).

### **2.2.2. Gènes différentiellement exprimés et codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse des proanthocyanidines.**

Afin de comprendre pourquoi la lignée 238 (marron) accumule plus de proanthocyanidines que la lignée *Astral* (**Résultats et Discussions-Chapitre 1, Figure 41**), une analyse comparative de l'expression des gènes connus pour altérer la production de proanthocyanidines et répertoriés dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* (**Synthèse bibliographique-chapitre 2, Tableau V**) a été effectuée dans les téguments de lin *Astral* et 238 à 24 JAF. Cette analyse a montré que 6 ESTs sont différentiellement exprimés (**Tableau XIV**).

Parmi ces 6 ESTs, un EST codant pour une glutathione S-transférase et un EST codant pour une protéine régulatrice WD40 sont surexprimés dans les téguments de la lignée *Astral* (genolin\_c28772 325 ; genolin\_c19694 483). Un EST codant pour une

glutathione S-transférase (genolin\_c313 781) et un EST codant pour une protéine régulatrice WD40 (genolin\_c54928 319) sont également surexprimés dans les téguments de la lignée 238.

**Tableau XIV : Différence d'expression des gènes putatifs impliqués dans la biosynthèse des proanthocyanidines dans les téguments de lin *Astral* et 238 à 24 JAF.**

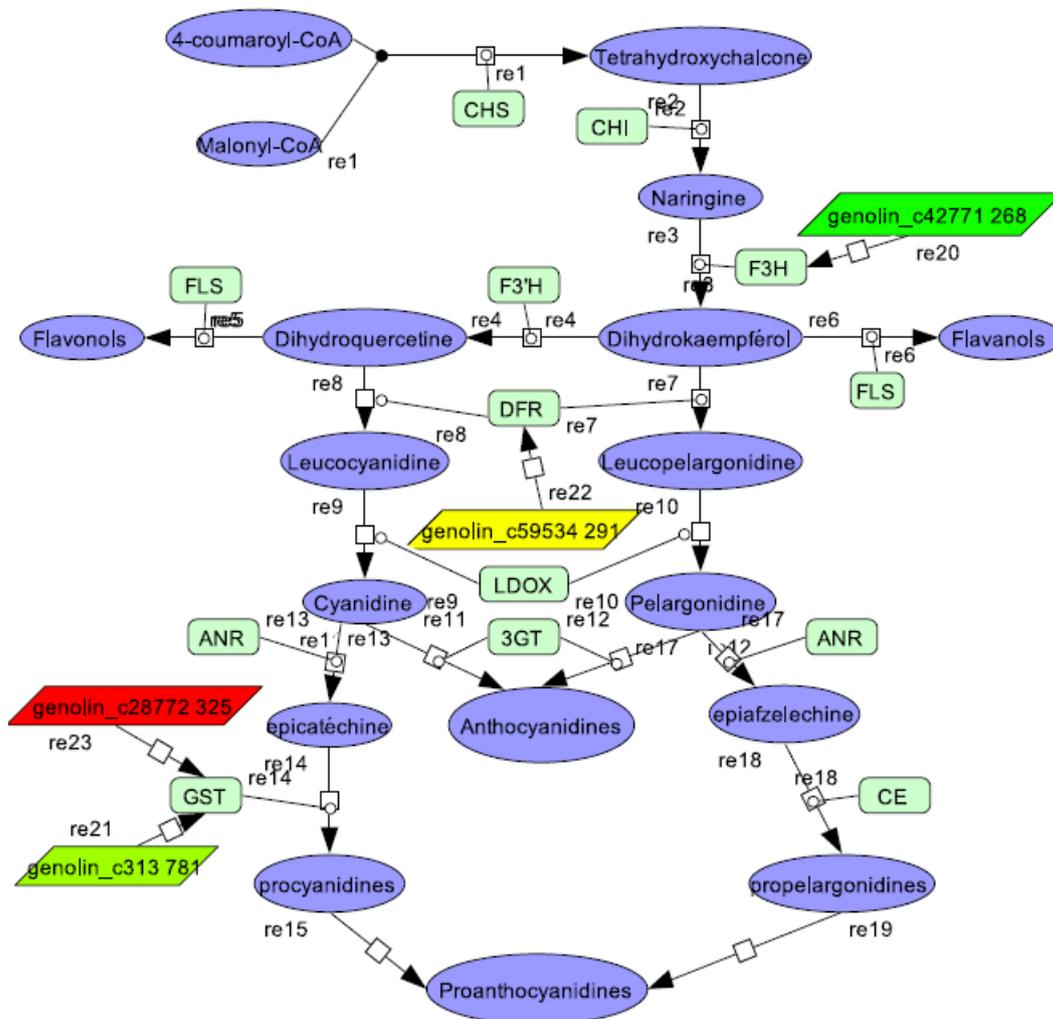
GENE ID	Log2ratio	Description de sgènes putatifs
genolin_c28772 325	2,44	Glutathione S-transferase
genolin_c19694 483	2,28	WD40-like
genolin_c59534 291	-2,03	Dihydroflavonol reductase
genolin_c54928 319	-2,35	WD40-like
genolin_c313 781	-2,75	Glutathione S-transferase
genolin_c42771 268	-3,86	Flavanone 3-hydroxylase

Log2 ratio a été calculé comme intensité de signal dans *Astral* vs 238. Les gènes surexprimés dans les téguments d'*Astral* par rapport à 238 à 24 JAF (log2ratio>2) sont représentés en rouge. Les gènes surexprimés dans les téguments 238 par rapport à *Astral* à 24 JAF (log2ratio >-2) sont représentés en vert.

Les analyses de mutants de la glutathione S-transférase et de protéines régulatrices WD40 ont montré une modification de la couleur des téguments des graines d'*Arabidopsis thaliana* (marron pour le témoin ; jaune pour mutant) et directement liée à la teneur en proanthocyanidines dans ces téguments. La surexpression d'un EST codant pour ces enzymes dans les téguments de la lignée *Astral* et la surexpression d'un EST codant pour ces enzymes dans les téguments de la lignée 238 et leurs implications dans de nombreux processus cellulaires ne permettent pas de conclure sur l'implication de ces protéines dans l'augmentation des teneurs en proanthocyanidines dans les graines des deux lignées de lin. L'analyse transcriptomique a toutefois montré que deux gènes (dihydroflavonol réductase : genolin\_c59534 291 ; flavanone 3-hydroxylase : genolin\_c42771 268), spécifiquement impliqués dans les voies de biosynthèse des flavonoïdes et régulant les teneurs des proanthocyanidines, sont surexprimés dans les téguments de la lignée 238 comparés aux téguments de la lignée *Astral* à 24 JAF.

L'analyse de mutants de la dihydroflavonol réductase et de la flavanone 3-hydroxylase dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* avait montré une diminution des teneurs de proanthocyanidines et d'anthocyanes accompagnée d'un changement de couleur des graines passant de marron à jaune. Ainsi la surexpression de la flavanone 3-hydroxylase dans les téguments de la lignée 238 pourrait engendrer une conversion plus

importante de la naringénine en dihydrokaempférol. La surexpression de la dihydroflavonol réductase pourrait permettre une synthèse plus importante de leucopelargonidine à partir de dihydrokaempférol, mais également de dihydroquercétine à partir de leucocyanidine (Figure 54).



**Figure 54 : Différences d'expression des gènes putatifs impliqués dans la biosynthèse des proanthocyanidines dans les téguments de lin *Astral* et 238 à 24 JAF.**

Les métabolites sont représentés par des formes ovales violettes, les enzymes par des rectangles verts et les gènes différenciellement exprimés par des rectangles contenant le préfixe « genolin ». Les ESTs surexprimés dans les téguments de *Astral*/238 sont en rouge. Les ESTs surexprimés ( $\text{Log}_2 : [2;5]$ ) dans les téguments 238 par rapport à *Astral* sont en jaune. Les ESTs surexprimés ( $\text{Log}_2 : [2;5;3]$ ) dans les embryons *Astral* par rapport à 238 sont en vert/jaune. Les ESTs surexprimés ( $\text{Log}_2 \geq 3$ ) dans les téguments 238 par rapport à *Astral* sont en vert. **Enzymes** : ANR : anthocyanidin reductase, CE : condensing enzyme, CHI : chalcone isomerase, CHS : chalcone synthase, DFR : dihydroflavonol-4-rductase, F3H : flavonol 3-hydroxylase, F3'H : flavonol 3'-hydroxylase, FLS : flavonol synthase; GST : glutathione S-transferase, LDOX : leucoanthocyanidin dioxygenase.

L'analyse de l'expression des ESTs codant pour des enzymes impliquées dans la biosynthèse des parois et connues pour réguler la teneur en proanthocyanidines et gènes

différentiellement exprimés dans les téguments des deux lignées de lin âgés de 24 JAF a montré que ces gènes ne sont pas différenciellement exprimés à 16 JAF, 38 JAF (**Annexe 1**).

### **2.2.3. Analyse des gènes différenciellement exprimés et codant pour des enzymes du métabolisme carboné et des facteurs de transcription.**

L'analyse biochimique effectuée sur les téguments des graines de lin a montré que la lignée accumulant le plus d'huile dans ses embryons (*Astral*) accumule moins de protéines dans les téguments de la lignée 238 (**Résultats et Discussions-Chapitre 1, Figure 47**) par rapport à la lignée *Astral*. L'analyse de l'expression des ESTs différenciellement exprimés dans les téguments des deux lignées de lin codant pour les enzymes du métabolisme carboné ainsi que les facteurs de transcription pourrait permettre de comprendre pourquoi la lignée *Astral* accumule moins de protéines dans les téguments.

10 gènes putatifs appartenant aux groupes fonctionnels des enzymes du métabolisme carboné et des facteurs de transcription, sont différenciellement exprimés entre les deux lignées testées (**Tableau XV**).

**Tableau XV : Différence d'expression des gènes putatifs impliqués dans le métabolisme carboné et des facteurs de transcription dans les téguments de lin *Astral* et 238 à 24 JAF.**

GENE ID	Log2ratio	Description des gènes putatifs
genolin_c58874 298	3,31	Glutamine synthetase
genolin_c54022 317	2,96	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 2
genolin_c13745 369	2,94	BZIP transcription factor
genolin_c55006 307	2,23	MYB transcription factor MYB161
genolin_c49953 336	2,13	Dof15
genolin_c48720 327	2,13	Nitrite reductase
genolin_c45975 306	2,06	MYB transcription factor MYB172
genolin_c42355 213	2,05	MYB transcription factor MYB161
genolin_c49244 277	2,05	Asparagine synthetase
genolin_c43581 210	-2,29	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase

Log2 ratio a été calculé comme intensité de signal dans *Astral* vs 238. Les gènes surexprimés dans les téguments d'*Astral* par rapport à 238 (log2ratio>2) sont représentés en rouge. Les gènes surexprimés dans les téguments 238 par rapport à *Astral* (log2ratio >-2) sont représentés en vert.

Parmi ces 10 ESTs, les gènes codant pour une nitrite réductase (genolin\_c48720 327), une asparagine synthétase (genolin\_c49244 277), une aldolase (genolin\_c54022 317), une

glutamine synthétase (genolin\_c58874 298) et des ESTs codant pour des facteurs de transcriptions de type BZIP (genolin\_c13745 369), DOF15 (genolin\_c49953 336), MYB161 (genolin\_c42355 213 ; genolin\_c55006 307) et MYB172 (genolin\_c45975 306) sont surexprimés dans les téguments de lin *Astral* par rapport aux téguments de la lignée 238 (**Tableau XV**).

Par contre, le gène codant pour une glucose 6 phosphate 1 déshydrogénase (genolin\_c43581 210) est surexprimé dans les téguments de la lignée 238 par rapport aux téguments de la lignée *Astral* (**Tableau XV**).

La surexpression des gènes codant pour des enzymes du métabolisme des acides aminés (une nitrite réductase (genolin\_c48720 327), une asparagine synthétase (genolin\_c49244 277), une glutamine synthétase (genolin\_c58874 298)) pourrait témoigner d'une synthèse plus importante de protéines dans les graines de la lignée *Astral* (**Tableau XV**). Toutefois les résultats obtenus lors de l'analyse biochimique réalisée sur les deux graines de lin étudiées sont en désaccord avec l'hypothèse précédente puisque la lignée *Astral* accumule moins de protéines dans ses téguments et embryons que la lignée 238 (**Résultats et Discussions-Chapitre 1, Figure 47**).

Toutefois, l'asparagine produite par l'asparagine synthase et la glutamine produite par la glutamine synthétase peuvent permettre la synthèse des sucres nécessaires à la synthèse des composés glucidiques (mucilage et paroi) par néoglucogenèse. Ce résultat serait en accord avec la surexpression observée pour le gène codant pour l'aldolase (genolin\_c54022 317) dans les téguments de la lignée *Astral* et pourrait expliquer les teneurs plus importantes de mucilage, de sucres totaux dans les graines de la lignée *Astral* par rapport aux graines de la lignée 238 (**Résultats et Discussions-Chapitre 1, Figure 38**).

L'asparagine et la glutamine pourraient également être importés dans l'embryon par des transporteurs spécifiques (Kim et Zambryski, 2005 ; **Synthèse bibliographique-Chapitre 2, Figure 11**). Un apport plus important de glutamine et d'asparagine dans les embryons de lin *Astral* pourrait permettre une synthèse plus importante de protéines et d'acides gras par rapport aux embryons de la lignée 238. En effet, dans la littérature, il a été montré que certains acides aminés, comme par exemple, la glutamine et l'asparagine pouvaient être importés dans les téguments à partir des embryons pour le maïs (Alonso et

*al.*, 2010). Ainsi, un apport carboné pour la synthèse des acides gras a pu être visualisé par un flux carboné accru au niveau de l'enzyme malique (Alonso *et al.*, 2010). Dans nos travaux, il n'a pas été observé de surexpression d'ESTs codant pour des transporteurs d'acides aminés dans les téguments à 24 JAF.

Les facteurs de transcriptions de type BZIP et DOF sont des activateurs de programmes de maturation des graines et également connus pour induire l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans l'assemblage des triglycérides. Ces enzymes ont été identifiées comme étant limitantes dans l'accumulation d'huile dans les graines et dans la formation des protéines de réserves dans différentes plantes oléagineuses (Wang *et al.*, 2007 ; Alonso *et al.*, 2009 ; Baud et Lepiniec, 2010). L'expression du gène GmbZIP123 de soja dans *Arabidopsis thaliana* a engendré une augmentation de la teneur en huile de 9 à 10 % dans les graines (Song *et al.*, 2013). Cependant, l'analyse transcriptomique effectuée sur les téguments de nos lignées sélectionnées de lin n'a pas pu mettre en évidence d'ESTs surexprimés et en relation avec la synthèse et la formation de triglycérides et/ou de protéines de stockage. Les facteurs de transcriptions DOF sont connus pour être impliqués dans la régulation de l'expression de gènes de la biosynthèse des acides gras (GmDof 4 ; GmDof 11) (Wang *et al.*, 2007 ) mais également dans d'autres fonctions telles que la réponse à la lumière, aux mécanismes de défense, à la germination et peuvent intervenir dans la biosynthèse des acides aminés (Yanagisawa, 2002). Toutefois, une recherche bibliographique ciblée sur ce facteur de transcription n'a pas permis de trouver une publication traitant d'une analyse biochimique d'un tel mutant ou d'une plante identifiée pour une surexpression du facteur de transcription Dof15.

Dans nos travaux, les gènes codant pour les facteurs de transcription LEC1, LEC2, WRI1, DOF, ABI3, FUS3, GL2, FIE, PHE, MINI3, IKU2, connus pour être des facteurs de transcriptions régulant l'expression des enzymes de la voie de biosynthèse des huiles et des acides aminés, n'ont pas été surexprimés dans les téguments de nos graines de lin (**Tableau XVI**).

Une surexpression de deux facteurs de transcription MYB, MYB 161 (genolin\_c42355 213) et MYB172 (genolin\_c45975) dans les téguments de la lignée *Astral* par rapport aux téguments de la lignée 238 a pu être observée (**tableau XV**). Les protéines MYB présente

un motif protéique de type hélice-tour-hélice (HTH) et sont capables de reconnaître spécifiquement les séquences « YAAC(G/T)G » de l'ADN ce qui leur permet de moduler la transcription de nombreux gènes. Les fonctions de la plupart des gènes MYB ne sont pas encore déterminées dans les plantes, mais les recherches ont montré que certains MYB interviennent dans le contrôle de l'expression de gènes codant pour des enzymes du métabolisme secondaire, des phénylpropanoïdes, des lignanes et des lignines (Bomal *et al.*, 2008). En effet, Bomal *et al.* en 2008 ont montré que les facteurs de transcriptions PtMYB1 et PtMYB8 de *Pinus taeda* exprimés chez *Picea glauca* induisaient la surexpression de gènes codant pour des PLR.

**Tableau XVI : Différence d'expression des gènes putatifs codant pour les facteurs de transcription LEC1, LEC2, WRI1, DOF, ABI3, FUS3, GL2, FIE, PHE, MINI3, IKU2 dans les téguments de lin *Astral* et 238 à 24 JAF**

GENE ID	Log2ratio (24 JAF)	Description des gènes putatifs
genolin_c17745 729	0,92	DOF4,6
genolin_c57680 259	0,81	Dof28
genolin_c22329 947	0,73	DOF4,6
genolin_c33994 382	0,55	Dof22
genolin_c23412 495	0,34	Dof zinc finger protein DOF2,4
genolin_c12473 955	0,06	Dof1
genolin_c25287 430	-0,06	Dof zinc finger protein
genolin_c14354 925	-0,09	Dof22
genolin_c9992 910	-0,23	GLABRA2 expression modulator
genolin_c13401 828	-0,26	Dof-type
genolin_c48032 197	-0,36	Transcription factor LEC1-B
genolin_c23464 589	-0,36	Abscisic acid insensitive
genolin_c34516 363	-0,44	Dof13
genolin_c49570 254	-0,44	Dof domain, zinc finger family protein
genolin_c6735 1250	-0,46	FUSCA3
genolin_c9194 400	-0,48	Dof1
genolin_c18069 440	-0,60	WRINKLED1-like protein
genolin_c10302 1280	-0,84	LEC14B homolog
genolin_c15113 368	-0,86	FIE
genolin_c24412 794	-1,12	Zinc finger, Dof-type
genolin_c6712 951	-1,57	LEC1-like protein

Log2 ratio a été calculé comme intensité de signal dans *Astral* vs 238. Les gènes surexprimés dans les téguments d'*Astral* par rapport à 238 (log2ratio>2) sont représentés en rouge. Les gènes surexprimés dans les téguments 238 par rapport à *Astral* (log2ratio >-2) sont représentés en vert.

Les travaux publiés par Goicoechea *et al.* (2005) et Legay *et al.* (2010) ont aussi montré que deux facteurs de transcription MYB de l'eucalyptus (EgMYB1 et EgMYB2) sont impliqués dans la régulation de la biosynthèse de la lignine en augmentant les teneurs de ces composés. Dans notre cas, un EST codant pour une caffeoyl-CoA-3-O méthyltransférase (CCOMT ; genolin\_c22036 371 ; **Tableau XIII**) est surexprimé dans les téguments de la lignée *Astral* en corrélation avec la surexpression de deux facteurs MYB (MYB 161 et MYB 172). Il a également été montré que la surexpression de facteurs de transcription de type MYB de *Leucaena leucocephala* pouvait induire une diminution de la teneur en lignine dans les plantes transgéniques de tabac (Omer *et al.*, 2013). La surexpression de ce type de facteur de transcription dans les téguments de la lignée *Astral* pourrait engendrer une lignification plus faible des téguments pouvant expliquer le poids moins important des parois extraites par rapport à celles extraites de la lignée 238. Cette surexpression des facteurs MYB dans la lignée *Astral* pourrait également expliquer pourquoi la lignée *Astral* présente plus de lignanes dans ses téguments (**Résultats et Discussions-Chapitre 1, Tableau XI**).

L'analyse des 10 ESTs appartenant aux groupes fonctionnels des enzymes impliquées dans le métabolisme carboné, des facteurs de transcription différenciellement exprimés (**Tableau XV**) et des gènes codant pour les facteurs de transcription LEC1, LEC2, WRI1, DOF, ABI3, FUS3, GL2, FIE, PHE, MINI3, IKU2 (**Tableau XVI**) n'a pas montré de différence significative d'expression dans les téguments des deux lignées de lin âgés de 16 JAF, 38 JAF (**Annexe 2**) à l'exception du facteur de transcription BZIP (genolin\_c13745 369) qui est surexprimé dans les téguments de la lignée *Astral* à 16 JAF. Ce résultat montre donc que l'expression de ces gènes n'intervient qu'à un stade bien spécifique.

### **2.3. Expression des ESTs dans les embryons de lin âgés de 24 JAF.**

L'analyse statistique de l'expression des ESTs dans les embryons de lin *Astral* et 238 à 24 DAF a montré que 1 593 ESTs sont différenciellement exprimés sur les 46 589 ESTs présents sur les puces "lin", soit 3 % des ESTs totaux. Sur ces 1 593 ESTs différenciellement exprimés entre *Astral* et 238, 1 250 ESTs sont surexprimés dans les embryons de lin *Astral* et 343 ESTs sont sous exprimés par rapport aux embryons de la lignée 238. Bien que le génome du lin soit séquencé (Wang *et al.*, 2012), ces ESTs ne sont pas tous annotés. En

effet, seulement 653 ESTs des 1 593 ESTs ont été répertoriés avec une fonction putative, soit 41 % des ESTs différentiellement exprimés (**Tableau XII**).

Afin de comprendre pourquoi les embryons de la lignée *Astral* accumulent plus d'huile mais moins de protéines que les embryons de la lignée 238, une analyse des résultats des 653 ESTs annotés et différentiellement exprimés a été effectuée entre les deux lignées dans les embryons à 24 JAF.

### **2.3.1. Expression des ESTs les plus différentiellement (log2ratio) exprimés dans les embryons des deux lignées de lin à 24 JAF.**

La majorité des ESTs différentiellement exprimés dans les embryons des deux lignées de lin à 24 JAF codent pour des transporteurs et des protéines de type conlinines et oléosines.

#### **2.3.1.1. Expression des ESTs codant pour des transporteurs.**

L'analyse des ESTs codant pour des transporteurs dans les embryons de lin *Astral* et 238 âgés de 24 JAF a montré que 10 ESTs (genolin\_c18105 363 ; genolin\_c45377 311 ; genolin\_c10753 576 ; genolin\_c36604 273 ; genolin\_c45644 259 ; genolin\_c41500 348 ; genolin\_c7854 666 ; genolin\_c44425 255 ; genolin\_c45967 285 ; genolin\_c40390 230) sont surexprimés dans les embryons de la lignée *Astral* par rapport aux embryons de la lignée 238. L'analyse a également montré que 3 ESTs sont surexprimés dans les embryons de la lignée 238 par rapport aux embryons de la lignée *Astral* à 24 JAF (**Tableau XVII**).

**Tableau XVII : Différence d'expression des gènes putatifs codant pour des transporteurs dans les embryons de lin *Astral* et 238 à 24 JAF.**

GENE ID	Log2ratio	Description des gènes putatifs
genolin_c18105 363	3,10	General substrate transporter ; Sugar transporter superfamily
genolin_c45377 311	2,94	ATP-binding cassette transporter AtABCA1
genolin_c10753 576	2,61	Transporter-like protein
genolin_c36604 273	2,43	Sugar transporter ERD6-like 5
genolin_c45644 259	2,32	Putative phosphate transporter 1
genolin_c41500 348	2,18	Hexose transporter
genolin_c7854 666	2,12	Transport protein subunit-like
genolin_c44425 255	2,10	ATP-binding cassette transporter AtABCA1
genolin_c45967 285	2,08	ATP-binding cassette transporter AtABCA1
genolin_c40390 230	2,02	Amino acid transport protein AAT1
genolin_c22289 318	-2.00	Putative amino acid transporter protein

genolin_c24867 290	-2,10	Putative polyol transported protein 2
genolin_c10110 1247	-2,37	Nitrite transporter

Log2 ratio a été calculé comme intensité de signal dans *Astral* vs 238. Les ESTs surexprimés dans les embryons d'*Astral* par rapport à 238 ( $\log_2\text{ratio}>2$ ) sont représentés en rouge. Les ESTs surexprimés dans les embryons 238 par rapport à *Astral* ( $\log_2\text{ratio} >-2$ ) sont représentés en vert.

La lignée présentant le plus d'huile et le moins de protéines (*Astral*) surexprime des ESTs codant pour des transporteurs de sucres (genolin\_c18105 363 ; genolin\_c36604 273 ; genolin 41500 348) par rapport à la lignée 238. La caractérisation d'un mutant d'un de ces transporteurs de sucres, *AtSUC5* d'*Arabidopsis thaliana*, a montré une diminution de la teneur en huile de 2 à 13 % (Baud *et al.*, 2005). Les auteurs ont émis l'hypothèse que le flux de carbone provenant des sucres a été bloqué par ce transporteur expliquant les teneurs plus faibles en huile dans les graines de ce mutant.

L'étude de ce transporteur a également révélé que celui-ci est capable de transporter la biotine, nécessaire à l'activité de nombreuses enzymes clés intervenant dans la voie de biosynthèse des acides gras comme l'acétyl-CoA carboxylase ou la pyruvate carboxylase, enzymes clés de la glycolyse (Baud *et al.*, 2005). Dans notre cas, les transporteurs de sucres (ERD6like5, ...) pourraient être des transporteurs permettant l'importation de sucres entre compartiment cytosolique/chloroplastique assurant des échanges d'hexoses entre ces compartiments et servant à alimenter en carbone les voies de biosynthèse des acides gras. Toutefois, ces transporteurs pourraient également agir comme transporteurs membranaires permettant d'effectuer un import de sucres du tégument vers l'embryon. Des expériences de culture *in vitro* d'embryons dans un milieu contenant des sucres marqués au carbone 13 pourraient permettre de définir les vitesses d'import de ces sucres dans ces embryons de façon à déterminer la fonction de ces transporteurs et leur rôle dans la synthèse d'huile. L'analyse des flux métaboliques dans les embryons de lin *Astral* et 238 pourrait également montrer si le transport des hexoses et des trioses entre les compartiments cytosolique et chloroplastique est affecté dans les embryons sous exprimant ces ESTs.

Dans nos expériences, la surexpression des gènes codant pour des transporteurs d'acides aminés (genolin\_c22289 318 ; genolin\_c24867 290 ; genolin\_c10110 1247) est observée pour la lignée (238) présentant le moins d'huile et le plus de protéines (**Résultats et Discussions-Chapitre 1, Figure 38**). Bien que la fonction de ces transporteurs ne soit pas décrite, ces transporteurs pourraient participer à l'importation d'acides aminés provenant

du tégument et nécessaire à la synthèse des protéines de réserves. La teneur différente en protéines dans les embryons de nos lignées de lin pourrait s'expliquer par ce résultat.

L'analyse de l'expression des 13 ESTs différenciellement exprimés à 24 JAF dans les embryons de lin n'a montré aucune différence significative d'expression à 32 JAF et 38 JAF dans les embryons des deux lignées de lin (**Annexe 3**). Ce résultat montre que la différence d'expression de ces ESTs est spécifique à 24 JAF, durant la phase de synthèse des acides aminés et des acides gras.

2.3.1.2. Expression des gènes codant pour la synthèse des protéines dans les embryons de lin Astral et 238 à 24 JAF.

Dans les embryons de lin âgés de 24 JAF, les ESTs les plus différenciellement exprimés codent pour des conlinines, des légumine et des oléosines (**Tableau XVIII**).

**Tableau XVIII : Différence d'expression des gènes putatifs codant pour des protéines de stockage dans les embryons de lin Astral et 238 à 24 JAF**

GENE ID	Log2ratio	Description des gènes putatifs
genolin_c50538 199	5,39	conlinin (cnl1 gene)
genolin_c25652 307	4,85	conlinin (cnl2 gene)
genolin_c34310 203	4,51	conlinin (cnl1 gene)
genolin_c24272 321	4,34	Conlinin
genolin_c46853 171	3,56	oleosin high molecular weight isoform (G4)
genolin_c8811 701	3,16	Legumin-like protein
genolin_c27476 364	3,12	Legumin B
genolin_c58146 179	2,92	oleosin low molecular weight isoform (9I) mRNA
genolin_c34460 353	2,71	oleosin high molecular weight isoform (G3) gene
genolin_c53852 192	2,69	conlinin (cnl2 gene)
genolin_c357 1789	2,67	Legumin-like protein
genolin_c58743 514	2,61	Legumin
genolin_c34497 190	2,58	conlinin (cnl1 gene)
genolin_c9252 232	2,57	conlinin (cnl2 gene)
genolin_c566 746	2,36	Oleosin low molecular weight isoform
genolin_c55834 198	2,33	conlinin (cnl2 gene)
genolin_c58762 372	2,32	Legumin B
genolin_c49931 151	2,22	cnl2 gene
genolin_c21404 514	2,19	Steroleosin
genolin_s21656 87	2,16	conlinin (cnl2 gene)
genolin_c46994 229	2,15	Conlinin

genolin_c37119 261	2,13	Conlinin
--------------------	------	----------

Log2 ratio a été calculé comme intensité de signal dans *Astral* vs 238. Les ESTs surexprimés dans les embryons d'*Astral* par rapport à 238 ( $\log_2\text{ratio} > 2$ ) sont représentés en rouge. Les ESTs surexprimés dans les embryons 238 par rapport à *Astral* ( $\log_2\text{ratio} > -2$ ) sont représentés en vert.

En effet, 12 ESTs codant pour des conlinines sont surexprimés dans les embryons de la lignée *Astral* à 24 JAF par rapport aux embryons de la lignée 238 (genolin\_c50538 199 ; genolin\_c24272 321 ; genolin\_c9252 232 ; genolin\_c55834 198 ; genolin\_c21656 87 ; genolin\_c25652 307 ; genolin\_c34497 190 ; genolin\_c46994 229 ; genolin\_c53852 192 ; genolin\_c37119 261 ; genolin\_c34310 203 ; genolin\_c49931 151) et 5 gènes codant pour des légumineuses (genolin\_c8811 701 ; genolin\_c27476 364 ; genolin\_c357 1789 ; genolin\_c58743 514 ; genolin\_c58762 372) (**Tableau XVIII**). Cinq gènes codant pour des protéines participant au stockage des lipides, les oléosines (genolin\_c58146 179 ; genolin\_c566746 ; genolin\_c46853 171 ; genolin\_c34460 353) et les stéréoléosines (genolin\_c21404 514) sont surexprimés dans les embryons de la lignée *Astral* par rapport aux embryons de la lignée 238 (**Tableau XVIII**).

Les oléosines et les stéréoléosines sont les protéines les plus abondantes dans les oléosomes jouant un rôle régulateur dans la formation des corps gras et dans l'accumulation des lipides. En effet, des travaux effectués par Hu *et al.* (2009) ont montré que les embryons de colza accumulant plus d'huile surexpriment les gènes codant pour ces protéines. Par contre Siloto *et al.* (2006) et Shimada *et al.* (2008) ont montré que la suppression de gènes codant pour ces protéines engendre une réduction de l'accumulation des huiles dans les graines d'*Arabidopsis thaliana*. Les travaux de Liu *et al.* en 2013 ont également montré que l'expression spécifique, dans les embryons de riz, de gènes codant pour des oléosines de soja engendrent une accumulation d'huile de 37 % à 46 % par rapport aux plantes non transformées. Cette augmentation de la teneur en huile s'est accompagnée d'une réduction de la teneur des protéines dans les graines. La surexpression de ces ESTs dans les embryons de la lignée *Astral* pourraient expliquer pourquoi cette lignée accumule plus d'huile et moins de protéines dans ses embryons que la lignée 238 (**Résultats et Discussions-Chapitre 1, Figure 8**).

Dans les embryons de lin âgés de 24 JAF, les gènes codant pour des conlinines et des légumineuses sont aussi différenciellement exprimés (**Tableau XVIII**). En effet, 17 ESTs sont surexprimés dans les embryons de la lignée *Astral* à 24 JAF par rapport aux embryons de la

lignée 238. Les conlinines sont des protéines de stockage de type albumine 2S et les légumine sont des protéines de stockage de type globuline 11S qui sont synthétisées au cours de la phase de maturation. Une teneur moins élevée en protéines dans les embryons de la lignée *Astral* ( $5,7\pm 0,1$  g/100g MS) que dans les embryons de la lignée 238 ( $9,0\pm 0,2$  g/100g MS) a été enregistrée semblant contredire les résultats de transcriptomique. Cependant, le dosage des protéines réalisé n'est pas spécifique d'une famille de protéines.

L'analyse de l'expression de ces ESTs différentiellement exprimés à 24 JAF dans les embryons de lin, n'a montré aucune différence significative d'expression à 32 JAF et 38 JAF dans les embryons des deux lignées de lin (**Annexe 4**). Ce résultat montre que la différence d'expression de ces ESTs est spécifique à 24 JAF, durant la phase de synthèse des acides aminés et des acides gras.

Si la surexpression des gènes codant pour des oléosines peut induire une accumulation plus importante d'huile, la différence des teneurs en huile dans les embryons des deux lignées de lin peut être due à l'expression plus importante de gènes codant pour des enzymes du métabolisme carboné, de la formation des triglycérides et de facteurs de transcriptions. C'est pourquoi, l'analyse transcriptomique dans les embryons de lin âgés de 24 JAF a été ciblée sur les ESTs différentiellement exprimés et codant pour les enzymes du métabolisme carboné primaire (glycolyse, cycle de Krebs, voies des pentoses phosphates, voies de biosynthèse des acides aminés, des acides gras) ainsi que sur les ESTs codant des gènes impliqués dans la formation et la synthèse des triglycérides et/ou des facteurs de transcriptions connus pour être des régulateurs de la quantité d'huile dans les graines.

### **2.3.2. Expression des gènes codant pour des enzymes du métabolisme carboné des embryons de lin *Astral* et 238 à 24 JAF.**

Dans les embryons des graines oléagineuses, le saccharose, glucose, fructose et la glutamine sont importés des téguments et métabolisés par les réactions du métabolisme carboné pour produire les précurseurs nécessaires à la synthèse des acides gras (Kim et Zambryski, 2005 ; Schwender *et al.*, 2004 ; Barvkar *et al.*, 2012). La différence d'expression des gènes codant pour des enzymes du métabolisme carboné entre *Astral* et 238 pourrait fournir des informations sur les voies métaboliques affectées et expliquer la différence des

teneurs en huile observées dans les embryons de ces deux lignées de lin. Dans les embryons de lin *Astral* et 238 à 24 DAF, une expression différentielle de 15 ESTs codant pour des enzymes du métabolisme carboné a pu être observée (**Tableau XIX**).

**Tableau XIX : Différence d'expression des gènes putatifs impliqués dans le métabolisme carboné dans les embryons de lin *Astral* et 238 à 24 JAF.**

GENE ID	Log2ratio	Description des gènes sputatifs
genolin_c54022 317	3,73	DHAP synthase p
genolin_c56523 320	3,42	Acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase
genolin_c58874 298	3,21	Glutamine synthetase
genolin_c41360 228	2,74	Fructose-bisphosphate aldolase
genolin_c10552 470	2,54	Aconitate hydratase
genolin_c10324 594	2,49	glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase
genolin_c1366 869	2,48	Pyruvate dehydrogenase
genolin_c49244 277	2,41	Asparagine synthetase
genolin_c4412 908	2,20	Ribulose bisphosphate carboxylase
genolin_c9583 1312	2,14	Malic enzyme
genolin_c26135 578	2,11	Fructose-bisphosphate aldolase
genolin_c52885 293	2,07	Aconitase
genolin_c58574 214	2,04	Glutamine synthetase
genolin_c6357 1530	2,01	Glutamate synthase [NADH]
genolin_c51232 303	-2,40	Fructose-bisphosphate aldolase

Log2 ratio a été calculé comme intensité de signal dans *Astral* vs 238. Les gènes surexprimés dans les embryons d'*Astral* par rapport à 238 ( $\log_2\text{ratio} > 2$ ) sont représentés en rouge. Les gènes surexprimés dans les embryons 238 par rapport à *Astral* ( $\log_2\text{ratio} > -2$ ) sont représentés en vert.

Parmi ces 15 ESTs, des gènes putatifs codant pour une DHAP synthase chloroplastique (genolin\_c54022 317), des fructose-bisphosphate aldolase (genolin c26135 578 ; genolin\_c41360 228), une glyeraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (genolin\_c10324 594), une pyruvate deshydrogénase (genolin\_c1366 869), une sous unité bêta d'une acétyl-CoA carboxylase carboxyltransférase (genolin\_c56523 320), une aconitase hydratase (genolin\_c10552 470), une aconitase (genolin\_c52885 293), la ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase (genolin\_c4412 908), une enzyme malique (genolin\_c9583 1312), une asparagine synthétase (genolin\_c49244 277), des glutamines synthétases (genolin\_c58874 298 ; genolin\_58574 214) et une glutamine synthase (genolin\_c6357 1530) sont surexprimés dans les embryons de la lignée *Astral* par rapport aux embryons de la lignée 238 à 24 JAF (**Tableau XIX**). L'EST codant pour une fructose-bisphosphate aldolase (genolin\_c51232 303) est surexprimé dans les embryons de la lignée 238 par rapport à la lignée *Astral* à 24 JAF (**Tableau XIX**).

Bien que ces ESTs soient statistiquement différentiellement exprimés dans les embryons certains sont plus exprimés que d'autres entre les deux lignées. Afin de visualiser les variations d'expression et d'identifier les ESTs les plus différentiellement exprimés entre les deux lignées de lin, la différence d'expression des ESTs à 24 JAF entre *Astral* et 238 a été représentée sur une carte comprenant les réactions du métabolisme carboné (**Figure 55**).

**Figure 55 : Différence d'expression des ESTs codant pour des enzymes du métabolisme carboné dans les embryons de lin *Astral* et 238 âgés de 24 JAF.**

Les ESTs différentiellement exprimés sont représentés dans des rectangles. Les ESTs surexprimés dans les embryons de 238/*Astral* sont en vert. Les ESTs surexprimés ( $\text{Log}_2 : [ 2 ; 2,5]$ ) dans les embryons *Astral* par rapport à 238 sont en jaune. Les ESTs surexprimés ( $\text{Log}_2 : [2,5 ; 3]$ ) dans les embryons *Astral* par rapport à 238 sont en orange. Les ESTs surexprimés ( $\text{Log}_2 [ \geq 3 ]$ ) dans les embryons *Astral* par rapport à 238 sont en rouge. **Métabolites** : GLNext : glutamine externe ; GLN : glutamine ; GLU : glutamate ; AKG : cétooglutarate ; SUCC : succinate ; FUM : fumarate ; MAL : malate ; OAA : oxaloacétate ; ICIT : isocitrate ; CIT : citrate ; AcCoA : acétyl-CoA ; PYRm : pyruvate mitochondriale ; PYRc : pyruvate cytosolique ; PEP : phosphoénolpyruvate cytosolique ; TP : triose phosphate ; G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate ; F6P : fructose-6-phosphate ; G6P : glucose-6-phosphate ; WALL : composés pariétaux ; GLC ext : glucose externe ; GLC : glucose ; STA : amidon ; H6Pp : hexose phosphate plastidial ; TPp : triose phosphate plastidial ; PEPp : phosphoénolpyruvate plastidial ; PYRp : pyruvate plastidial ; AcCoAp : acétyl-CoA plastidiale ; P5Pp : ribose-5-phosphate ; S7Pp : sedoheptulose 7-phosphate ; E4Pp : érythrose-4-phosphate plastidial ; CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone ; TAG : triglycéride ; Les métabolites comportant le suffixe eff sont les métabolites dosés. **Enzymes** : Vg : import de glucose ; Vhk1 : hexokinase ; Vgf : phosphoglucose isomérase ; Vald : aldolase ; Vglyco : phosphoglycérate ; Vpep : enolase ; Vpk : pyruvate kinase ; Vpyp : transport de pyruvate ; Vpdh : pyruvate déshydrogénase ; Vcs : citrate synthase ; Vca : aconitase ; Viso : isocitrate déshydrogénase ; Vsfa : cetoglutarate déshydrogénase ; Vfum1/2 : succinate déshydrogénase ; Vfum : fumarase ; Vmdh : malate déshydrogénase ; Vme : pyruvate carboxylase ; Vakg : glutamate déshydrogénase ; Vglueff : glutamate synthase ; Vgl : glutamate synthase ; Va : entrée de glutamine ; Vfas2/3 : glycérol 3-phosphate déshydrogénase ; Vtcp : transporteur de triose phosphate entre le cytosol au chloroplaste ; Vpep : transporteur de pep du cytosol vers le chloroplaste ; Vstsp/Vsta : enzyme branchante ; Valdp : aldolase plastidial ; Vglycp : phosphoglycérate plastidial ; Vpkp : pyruvate kinase plastidial ; Vpdhp : pyruvate déshydrogénase plastidiale ; Vfas1 : acétyl-CoA carboxylase plastidiale ; Vpp1 : gluconate déshydrogénase ; Vpp2 : transcétolase ; Vpp3 : transaldolase ; Vpp4 : DHAP synthase ; Vrubi : ribulose 1,5 bisphosphate.

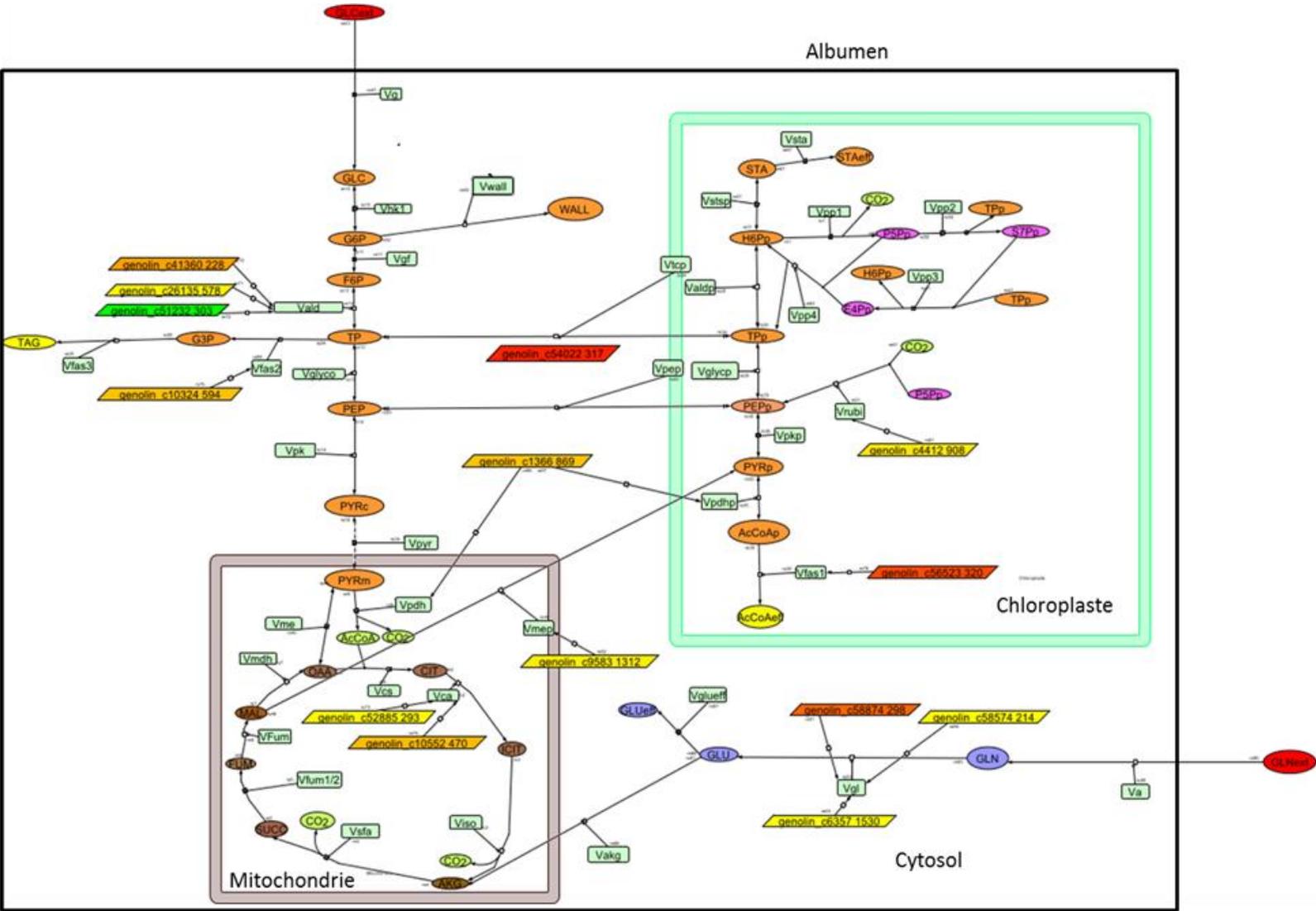


Figure 55 : Différence d'expression des ESTs codant pour des enzymes du métabolisme carboné dans les embryons de lin *Astral* et *238* âgés de 24 JAF.

### 2.3.2.1. Expression de la DHAP synthase, des aldolases et de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.

L'analyse des différences d'expression des gènes putatifs codant pour des enzymes du métabolisme carboné dans les embryons de *Astral* et 238 à 24 JAF a montré que l'EST le plus différenciellement exprimé code pour une DHAP synthase plastidiale (genolin\_c54022 317; **Tableau XIX ; Figure 55**). La DHAP synthase est une enzyme permettant la synthèse de la DHAP à partir de phosphoénolpyruvate et d'érythrose 4-phosphate. Le DHAP est un précurseur de la voie du shikimate qui permet la biosynthèse des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane). La surexpression de la DHAP synthase plastidiale dans les embryons de la lignée *Astral* par rapport aux embryons de la lignée 238 pourrait indiquer une synthèse plus importante du DHAP nécessaire à la synthèse des acides aminés aromatiques. Cependant, les accumulations différentielles de la tyrosine et du tryptophane n'ont pu être déterminées au cours de la synthèse des lipides dans les embryons des deux lignées testées mais pourraient être influencées par une synthèse plus importante de DHAP. Les accumulations de la phénylalanine dans les embryons *Astral* et 238 entre 16 et 32 JAF sont similaires (**Résultats et Discussions-Chapitre 1, Figure 51**) montrant que la surexpression de cet EST dans les embryons de lin *Astral* n'influence pas les teneurs en phénylalanine.

Les auteurs ayant réalisé l'analyse protéomique dans les embryons de lin au cours de la phase d'accumulation des huiles (Barvkar *et al.*, 2012) ont montré la présence de transporteurs dans les plastes et le cytosol qui pourrait indiquer des échanges de DHAP entre ces deux compartiments (**Synthèse Bibliographique-Chapitre 2, Figure 13**). Le DHAP peut également produire le glycérol-3-phosphate (G3P) par la G3PDH (glycérol-3-phosphate déshydrogénase). Or le G3P est nécessaire à l'accumulation des acides gras sous forme de TAG puisque les triglycérides sont composés de 3 acides gras estérifiés sur un G3P. La surexpression de la G3PDH assurant la conversion du DHAP en G3P a permis d'augmenter de 40 % la teneur en lipides dans les graines matures de colza (Vigeolas *et al.*, 2007). Or, l'analyse transcriptomique effectuée dans les embryons de nos deux lignées de lin à 24 JAF a montré que la lignée *Astral* surexprime un gène codant pour une G3PDH (genolin\_c10324 594). La surexpression de la G3PDH pourrait ainsi permettre une conversion plus importante de DHAP en G3P, nécessaire à la formation des TAG. L'analyse transcriptomique a également

montré une surexpression de gènes codant pour des aldolases (genolin\_c26135 578 ; genolin\_c41360 228 ; **Tableau XIX ; Figure 55**) dans les embryons de la lignée *Astral* par rapport à la lignée 238 à 24 JAF et d'un EST codant pour une aldolase (genolin\_c51232 303) dans les embryons de lin 238 par rapport aux embryons de la lignée *Astral*. L'aldolase est une enzyme connue pour catalyser la réaction permettant la synthèse de glycéraldéhyde-3-phosphate et de DHAP à partir de fructose-1,6-bisphosphate. Les travaux effectués par Zeng *et al.* (2014) ont montré que la surexpression de l'aldolase engendrait une augmentation de la teneur en huile dans les graines de *Camellia oleifera*. L'hypothèse émise serait que l'aldolase contrôlerait le flux de carbone d'intermédiaires métabolites clés tels que la glycéraldéhyde-3-phosphate cytosolique. Dans nos travaux, cette surexpression observée pour les aldolases pourrait conduire à une synthèse plus importante de glycéraldéhyde-3-phosphate cytosolique qui servirait à alimenter la synthèse de glycérol-3-phosphate *via* la glycérol-3-phosphate-déshydrogénase. Le glycérol-3-phosphate étant le squelette des TAGs, une activité plus importante de l'aldolase pourrait permettre une synthèse plus importante de ces composés clés et conduire à une production d'huile plus importante. En effet, dans la littérature, une des étapes limitantes à la production des triglycérides est la disponibilité de la glycérol-3-phosphate (Vigeolas et Geigensberger, 2004 ; Zeng *et al.*, 2014). L'analyse de l'expression de ces ESTs à 32 et 38 JAF n'a pas montré de différence d'expression significative ( $\text{Log}_2\text{ratio} > \text{ou} < 2$ ). Ce résultat indique que l'expression différentielle de ces gènes s'effectue durant le stade d'accumulation des triglycérides (**Annexe 5**).

#### 2.3.2.2. Expression des glutamines synthétases, aconitases, de l'enzyme malique et de la pyruvate déshydrogénase.

L'analyse statistique de l'expression des ESTs dans les embryons de lin *Astral* et 238 âgés de 24 JAF a également montré une surexpression des gènes codant pour une asparagine synthétase (genolin\_c49244 277), des glutamines synthétases (genolin\_c58874 298 ; genolin\_58574 214), une glutamate synthase (genolin\_c6357 1530), dans les embryons de la lignée *Astral* (**Tableau XIX ; Figure 55**). La surexpression de la glutamine synthase chez la lignée *Astral* pourrait permettre une synthèse plus importante de glutamine à partir du glutamate, mais également une fixation plus importante de  $\text{NH}_3$  qui peut être toxique pour la cellule. Toutefois la différence d'expression de cet EST est moins importante que celles des ESTs codant pour les glutamines synthétases entre la lignée *Astral* et 238 (**Tableau XIX ;**

**Figure 55).** Ce résultat semblerait témoigner pour une utilisation plus importante de glutamate pouvant alimenter le cycle de Krebs. Dans les embryons de maïs, il a été montré que la glutamine importé des téguments est un substrat pour la synthèse des acides gras *via* une remobilisation des carbones provenant de la glutamine et leur redirection vers le cycle de Krebs par l'enzyme malique (Alonso *et al.*, 2010).

Or, l'analyse transcriptomique a également montré une surexpression d'ESTs codant pour des enzymes du cycle de Krebs (aconitase : genolin\_c10552 470 ; genolin\_c52885 293) et un gène codant pour l'enzyme malique (genolin\_c9583 1312) dans les embryons de la lignée *Astral* à 24 JAF par rapport aux embryons de la lignée 238 (**Tableau XIX ; Figure 55**). Le lin semblerait avoir un comportement similaire à celui observé chez le maïs et pouvant expliquer la teneur en huile différente entre les deux lignées. Des analyses d'incubation d'embryons marqués avec de la glutamine au  $^{13}\text{C}$  seraient nécessaires pour suivre le devenir de ces  $^{13}\text{C}$  et ainsi définir le rôle de la glutamine comme substrat de la synthèse des acides gras ainsi que la contribution de l'enzyme malique à la synthèse des acides gras. Aucune différence significative de l'expression de ces ESTs à 32 JAF et 38 JAF n'a pu être mise en évidence.

#### 2.3.2.3. Rôle de la ribulose 1,5 bisphosphate.

La lignée présentant le plus d'huile et le moins de protéines (*Astral*), présente une surexpression des ESTs codant pour une ribulose 1,5 biphosphate carboxylase (genolin\_c4412 908) et pour une pyruvate déshydrogénase (genolin\_c1366 869 ; **Tableau XIX ; Figure 55**). La ribulose 1,5 bisphosphate est une enzyme clé du mécanisme de la photosynthèse assurant la captation du  $\text{CO}_2$  et une production de NADPH, coenzyme important pour la synthèse des lipides. La pyruvate déshydrogénase est une enzyme intervenant dans la décarboxylation du pyruvate en acétyl-CoA. La surexpression des ESTs codant pour une pyruvate déshydrogénase et une ribulose 1,5 bisphosphate dans les embryons de la lignée *Astral* suggèrerait une synthèse plus importante de ces enzymes qui pourraient assurer une conversion plus efficace du carbone pour la synthèse des acides gras.

Les travaux réalisés par Schwender *et al.*, 2004 sur le colza ont montré que la ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase permet non seulement la fixation de  $\text{CO}_2$  lors de la synthèse des huiles mais peut également limiter les pertes de carbone ( $\text{CO}_2$ ) dans les réactions

utilisant la pyruvate déshydrogénase. Ce mécanisme conduit à 20% d'acétyl-CoA en plus disponible pour la synthèse des lipides. Ruuska *et al.* (2004) ont montré que les embryons de plantes de colza cultivées en présence de lumière présentent une teneur en huile de 23 % plus élevée que celle observée dans les embryons cultivés à l'obscurité. Ceci pourrait être lié à une activité plus importante de la ribulose 1,5 bisphosphate. L'expression plus importante de la pyruvate déshydrogénase (genolin\_c1366 869; **Tableau XIX ; Figure 55**) dans les embryons de lin *Astral* pourrait permettre une captation de CO<sub>2</sub> plus importante et qui pourrait être fixé par la ribulose 1,5 bisphosphate, limitant les pertes de carbones et maximisant la transformation des sucres en acides gras.

Dans nos travaux, la surexpression de l'EST codant pour la pyruvate déshydrogénase (genolin\_c1366 869 ; **Tableau XIX ; Figure 55**) dans la lignée *Astral* présentant le plus d'huile, pourrait également contribuer à augmenter le pool d'acétyl-CoA mitochondrial. Dans la lignée *Astral*, les gènes putatifs codant pour des aconitases (genolin\_c10552 470 ; genolin\_c52885 293) et l'enzyme malique (genolin\_c9583 1312) sont également surexprimés (**Tableau XIX ; Figure 55**). Ainsi, le pool d'acétyl-CoA mitochondrial pourrait être transféré vers le chloroplaste pour la synthèse des acides gras *de novo* via l'enzyme malique, en transitant par le cycle de Krebs. Dans notre cas, il se pourrait que la contribution du CO<sub>2</sub> produit par la réaction induite par la surexpression de la pyruvate déshydrogénase soit plus importante pour la synthèse des acides gras que la contribution de l'acétyl-CoA cytosolique. L'analyse des flux métaboliques dans les embryons des deux lignées de lin permettrait de répondre à cette hypothèse.

#### 2.3.2.4. L'acétyl-CoA carboxylase.

La lignée présentant le plus d'huile (*Astral*) surexprime un EST codant pour l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase) correspondant à la sous unité  $\beta$ -carboxyltransférase (genolin\_c56523 320). L'ACCase est la première enzyme intervenant dans la voie de biosynthèse des acides gras en permettant la carboxylation de l'acétyl-CoA avec l'ion bicarbonate pour former le malonyl-CoA. La surexpression de l'ACCase cytosolique d'*Arabidopsis thaliana* dans les plastes de colza a conduit à une augmentation de la teneur en huile de 5 % (Roesler *et al.*, 1997). Une surexpression plus importante de la sous unité  $\beta$ -carboxyltransférase de l'acétyl-CoA carboxylase pourrait permettre une activité plus

importante de l'acétyl-CoA carboxylase induisant un flux de carbone plus important pour la synthèse des acides gras. Cette hypothèse semblerait confirmer l'observation faite d'une vitesse de synthèse d'huile plus importante dans les embryons de la lignée *Astral* que de la lignée 238 (Résultats et Discussions-Chapitre 1, Figure 48).

**2.3.3. Expression de gènes putatifs codant des enzymes de la voie de biosynthèse *de novo* des acides gras et de la formation des triglycérides dans les embryons de lin *Astral* et 238 à 24 JAF.**

L'expression des ESTs codant pour les enzymes de la voie de biosynthèse *de novo* des acides gras dans les embryons des deux lignées de lin testées à 24 JAF a montré des différences significatives. En effet, des ESTs codant pour la  $\Delta$ 12 désaturase (genolin\_c32030 289), l'oméga-3-fatty acid desaturase (genolin\_c13821 432) et la FAD3 (genolin\_c58747 320) sont surexprimés dans la lignée présentant le plus d'huile (*Astral*) (Tableau XX). Une EST codant pour la FAS2 (genolin\_c28645 231) est quant à elle surexprimée dans les embryons de la lignée 238 par rapport aux embryons de la lignée *Astral*.

**Tableau XX : Différence d'expression des gènes codant pour des enzymes de la synthèse *de novo* dans les embryons de lin *Astral* et 238 à 24 JAF.**

Log2 ratio a été calculé comme intensité de signal dans *Astral* vs 238. Les gènes surexprimés dans les embryons d'*Astral* par rapport à 238 (log2ratio>2) sont représentés en rouge. Les gènes surexprimés dans les embryons 238 par rapport à *Astral* (log2ratio >-2) sont représentés en vert.

GENE ID	Log2ratio	Description des gènes putatifs
genolin_c58747 320	3,79	Fatty acid desaturase 3A
genolin_c32030 289	2,33	$\Delta$ 12-fatty acid desaturase
genolin_c13821 432	2,06	Omega-3 fatty acid desaturase. chloroplastic
genolin_c28645 231	-2,06	FAS2

Bien que ces différents gènes soient statistiquement différentiellement exprimés dans les embryons de ces deux lignées de lin, les ESTs le sont plus que d'autres.

L'analyse de l'expression des ESTs différentiellement exprimées dans les embryons des deux lignées de lin a montré que l'EST codant pour une FAD3A (genolin\_c58747 320) est le gène le plus surexprimé dans les embryons de lin *Astral*/238 à 24 JAF. La FAD3 est une enzyme permettant la formation de l'acide linoléique (18:3) à partir de l'acide linoléique (18:2). Une autre EST codant pour une oméga-3-désaturase (genolin\_c13821 432) permettant la formation de l'acide linoléique à partir de l'acide linoléique est également surexprimée dans les embryons de la lignée *Astral*/238. L'analyse transcriptomique a également montré que la  $\Delta$ 12 désaturase (FAD 2) permet l'ajout d'une double liaison sur le

carbone 12 de l'acide oléique (18:1), formant ainsi l'acide linoléique (18:2). La surexpression de ces ESTs dans les embryons de la lignée Astral/238 pourrait montrer une teneur plus élevée d'acide linoléique dans les embryons de lin *Astral*. Les résultats obtenus au niveau biochimique ont indiqué que le profil en acide gras n'est pas modifié dans les graines de lin (**Résultats et Discussions-Chapitre 1, Figure 13**). Les travaux effectués par Rajwade *et al.* en 2014 sur les graines de lin présentant des teneurs en acide linoléique différentes ont montré que ces teneurs ne sont pas dépendantes de l'expression d'un seul gène, mais de l'activité cumulée de 3 désaturases (FAD2-2, FAD 3A, FAD3B) agissant simultanément. Ces gènes sont surexprimés dans les embryons de la lignée *Astral* exclusivement à 24 JAF (**Annexe 6**). L'analyse de l'expression des gènes codant pour la glycérol-3-phosphate acyltransférase, lysophosphatidic acid acyltransférase, diacylglycérol acyltransférase n'a pas montré de différences d'expression à 24, 32, 38 JAF dans les embryons des deux lignées de lin (**Annexe 7**).

#### **2.3.4. Expression des gènes putatifs codant pour des facteurs de transcription dans des embryons de lin *Astral* et 238 à 24 JAF.**

Les travaux récents concernant l'analyse du métabolisme lipidique dans les embryons d'*Arabidopsis thaliana* a montré que la différence de quantité d'huile observée dans ces embryons pouvait être due à l'expression différentielle de facteurs de transcription. En effet certains facteurs de transcription tels que LEC1, LEC2, WRI1, DOF, ABI3, FUS3, GL2, FIE, PHE, MINI3, IKU2, bZIP sont connus pour contrôler l'expression de gènes codant pour des enzymes des voies de biosynthèse des acides gras, du métabolisme centrale ou régulant directement les teneurs en huiles par des mécanismes encore peu connus (Baud et Lepiniec, 2010). Dans nos travaux, l'analyse de l'expression de ces facteurs de transcription dans les embryons de lin âgés de 24, 32 et 38 JAF n'a pas montré de différence significative ( $\log_2\text{ratio} < \text{ou} > 2$ ) entre ces stades (**Annexe 8**) à l'exception du facteur de transcription codant pour un bZIP (genolin\_c11735 1436) et à 38 JAF. La surexpression de cet EST dans les embryons de lin 238 par rapport aux embryons de lin *Astral* est exclusive à 38 JAF (**Annexe 8**). Or, les teneurs en huile dans les graines de lin n'évoluent plus à partir de 32 JAF (**Résultats et Discussions-Chapitre 1: Figure 48**). Il semble donc peu probable que ce facteur de transcription régule les teneurs en lipides dans les graines des deux lignées de lin.

L'analyse transcriptomique réalisée pour les embryons des lignées *Astral* et 238 a montré qu'un EST codant pour le facteur de transcription bHLH (genolin\_c685 609) est surexprimé dans les embryons de lin 238 alors que deux ESTs codant pour des facteurs de transcription de type WRKY4 (genolin\_c56805 399) et MYB 161 (genolin\_c55006 307) sont surexprimés dans les embryons de la lignée *Astral* à 24 JAF (**Tableau XXI**). Ces 3 ESTs sont spécifiquement et différemment exprimés dans les embryons des deux lignées de lin à 24 JAF et durant la synthèse des acides gras (**Tableau XXI**).

**Tableau XXI: Différence d'expression des gènes putatifs codant pour des facteurs de transcription dans les embryons de lin *Astral* et 238 à 24 JAF.**

GENE ID	Log2ratio (24 JAF)	Log2ratio (32 JAF)	Log2ratio (38 JAF)	Gene description
genolin_c56805 399	2,39	-0,85	-0,64	Transcription factor WRKY4
genolin_c55006 307	2,10	0,70	0,15	MYB transcription factor MYB161
genolin_c685 609	-2,00	-0,16	0,37	BHLH transcription factor

Log2 ratio a été calculé comme intensité de signal dans *Astral* vs 238. Les gènes surexprimés dans les embryons d'*Astral* par rapport à 238 ( $\log_2\text{ratio} > 2$ ) sont représentés en rouge. Les gènes surexprimés dans les embryons 238 par rapport à *Astral* ( $\log_2\text{ratio} > -2$ ) sont représentés en vert.

Les fonctions des bHLH sont variées et leur implication dans la régulation de la biosynthèse des flavonoïdes et des proanthocyanidines (AtbHLH042; Nesi *et al.*, 2000), dans la voie de signalisation des phytohormones tel que la déhiscence de la silique chez *Arabidopsis thaliana* (AtbHLH073; Rajani et Sundaresan, 2001 ; AtbHLH040; Lijegren *et al.*, 2004) et dans le développement de l'épiderme des carpelles (AtbHLH026; Payne *et al.*, 2000 et AtbHLH024; Heisler *et al.*, 2001) ont été répertoriées. Dans nos travaux, il est impossible de conclure sur l'action de la surexpression de cet EST dans les embryons de notre lignée 238.

La lignée *Astral* présentant le plus d'huile surexprime un EST codant pour le facteur de transcription WRKY4 (genolin\_c56805 399). Les facteurs de transcription de type WRKY constituent une famille de protéines spécifiques impliquées dans la résistance des plantes aux parasites (Ülker et Somssich, 2004 ; Eulgem, 2006). L'analyse du mutant WRKY4 dans *Arabidopsis thaliana* a montré que ce facteur de transcription joue un rôle dans la résistance des plantes aux pathogènes nécrotrophiques. La surexpression de ce facteur de transcription semblerait montrer que les plantes de la lignée *Astral* ont subi un stress biotique. Or, la

culture des deux lignées de lin a été effectuée dans une même serre phytotronique sous des conditions contrôlées. Aucune maladie n'a été détectée lors de la culture de ces plantes.

Un facteur de transcription de type MYB 161 (genolin\_c55006 307) est surexprimé dans les embryons de la lignée *Astral* par rapport aux embryons de la lignée 238. Ce facteur de transcription est également surexprimé dans les téguments de la lignée *Astral* par rapport aux téguments de la lignée 238 à 24 JAF. Les recherches ont montré que certains facteurs MYB interviennent dans le contrôle de l'expression de gènes codant pour des enzymes du métabolisme secondaire, des phénylpropanoïdes, des lignanes (Strake *et al.*, 2001 ; Bomal *et al.*, 2008). La surexpression de cet EST dans la lignée 238 pourrait expliquer pourquoi la lignée *Astral* semble présenter une teneur en paroi moins élevée que celle observée dans la lignée 238.

#### **2.4. Bilan des analyses transcriptomiques dans les embryons et les téguments des deux lignées de lin.**

L'analyse transcriptomique effectuée dans les téguments et les embryons des deux lignées de lin à 24 JAF a permis d'émettre des hypothèses expliquant les différences d'accumulation des composés de réserves dans les graines des deux lignées de lin.

L'analyse transcriptomique effectuée dans les téguments des deux lignées de lin a mis en évidence la surexpression de gènes codant pour la synthèse et la modification des parois végétales (glycosyltransférase : genolin\_c26492 285 ; cellulose synthase : genolin\_c1510 778 ; genolin\_c31895 293 ; genolin\_c18432 413) dans les téguments de la lignée 238/*Astral*. Ces différences d'expression pourraient induire une synthèse plus importante de composés pariétaux contribuant au poids plus important des téguments de la lignée 238 que de ceux de la lignée *Astral*. Le poids des téguments plus important de la lignée 238/*Astral* pourrait également être dû à une accumulation plus importante de proanthocyanidines dans les téguments de la lignée 238/*Astral*. Nous avons pu mettre en évidence la surexpression de deux gènes codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse des proanthocyanidines (dihydroflavonol réductase : genolin\_c59534 291 ; flavanone 3 hydroxylase : genolin\_c42771 268) qui pourraient expliquer les différences d'accumulation de ce composé entre les deux lignées.

Dans ce travail, l'analyse transcriptomique effectuée dans les embryons des deux lignées de lin a indiqué la surexpression de gènes codant pour des transporteurs de sucres (genolin\_c18105 363 ; genolin\_c36604 273 ; genolin\_c41500 348) dans les embryons de la lignée *Astral/238*. Ces transporteurs pourraient permettre un import de sucres plus important dans l'embryon ou un transport de sucres entre compartiments qui pourraient permettre une synthèse plus importante d'acides gras dans les embryons de la lignée *Astral/238*. Nous avons pu également mettre en évidence la surexpression de gènes codant pour la DHAP synthase (genolin\_c54022 317), de la G3PDH (genolin\_c10324 594), des aldolases (genolin\_c41360 228 ; genolin\_c26135 578) qui pourraient induire une synthèse plus importante de G3P nécessaire à la formation des triglycérides.

La surexpression plus importante d'ESTs codant pour des glutamines synthétases (genolin\_c58874 298 ; genolin\_c58574 214), des aconitases (genolin\_c52885 293 ; genolin\_c10552 470) et l'enzyme malique (genolin\_c9583 1312) dans les embryons de la lignée *Astral/238* pourrait permettre une utilisation plus importante des carbones de la glutamine pour la synthèse des acides gras.

La surexpression plus importante des gènes codant pour la ribulose 1,5 bisphosphate (genolin\_c4412 908), la pyruvate déshydrogénase (genolin\_c1366 869) et la sous unités bêta de l'acétyl-CoA carboxylase (genolin\_c56523 320) pourrait également contribuer à l'accumulation plus importante d'huile dans les embryons de la lignée *Astral/238*.

Pour mieux comprendre la différence d'accumulation entre les deux lignées de lin, il est nécessaire de comprendre comment sont organisées les synthèses, quels sont les précurseurs nécessaires à la synthèse des acides gras et quelles voies métaboliques conduisent à la synthèse des acides gras dans les embryons de lin. Une analyse des flux métaboliques pourrait permettre de définir cela et une comparaison de ces flux entre les deux lignées pourrait déterminer les voies importantes pour la synthèse de ces composés.

### **CHAPITRE 3 : ANALYSE DES FLUX METABOLIQUES DANS LES EMBRYONS DES LIGNEES DE LIN ASTRAL ET 238.**

Pour déterminer comment les synthèses sont organisées dans les graines de lin et comprendre les différences observées dans l'accumulation des huiles dans ces deux lignées de lin, une analyse fluxomique a été entreprise.

La fluxomique est une technique permettant d'analyser l'ensemble des flux métaboliques au sein d'une cellule ou d'un organisme. Cette technologie nécessite la culture d'embryons dans un milieu de culture en présence de substrats marqués au carbone 13. Ces substrats sont métabolisés au cours du temps par les embryons. Les différentes réactions s'établissant dans l'embryon engendrent une répartition des carbones 13 provenant des substrats dans les différents métabolites produits. Cette répartition devient stable lorsque l'état métabolique et l'état isotopique stationnaire sont atteints. Les enrichissements isotopiques des différents métabolites peuvent être déterminés par des techniques analytiques de spectrométrie de masse (isotopomères de masse) ou de RMN (isotopomères de position). Ces données sont alors renseignées dans un fichier informatique (Fichier.ftbl). Dans ce fichier, sont également ajoutés, les flux extracellulaires mesurés et les différentes réactions du réseau correspondant aux réactions s'établissant dans l'embryon. Un logiciel de calcul de flux va prendre en compte ces mesures pour déterminer les flux métaboliques (Schwender *et al.*, 2011).

Aucune analyse de fluxomique n'a été répertoriée chez le lin. Dans ce travail et dans un premier temps, il a été nécessaire de développer une méthodologie adéquate de culture des embryons de lin et de définir un milieu de culture *in-vitro* permettant de reproduire des vitesses de synthèses pour les composés de réserves analogues à celles observées dans les embryons cultivés *in-planta*. Il a également été nécessaire de développer un protocole d'extraction des composés de ces embryons et de mettre en place des méthodologies d'analyses de ces composés. Suite à ces expériences, les états métabolique et isotopique stationnaire indispensable pour l'analyse des flux métaboliques, ont pu être déterminés. Les connaissances des voies de biosynthèse se déroulant spécifiquement dans les embryons de lin sont encore faibles. De ce fait, il a également été nécessaire de déterminer quelles réactions étaient présentes dans les embryons de lin et si ces réactions étaient réversibles ou non. Ces données serviront à développer un réseau spécifique de réactions se déroulant

dans les embryons de lin qui sera intégré dans un fichier informatique (Fichier.ftbl). Les données d'enrichissements et les mesures des flux métaboliques seront également intégrées à ce fichier informatique pour le calcul des flux métaboliques. L'ensemble de ces données nous permettra d'obtenir les flux métaboliques dans les embryons de lin. L'obtention de ces flux métaboliques nous indiquera le chemin métabolique optimal utilisé pour la synthèse des lipides et acides gras dans les embryons de lin ainsi que l'origine des cofacteurs nécessaires à ces synthèses. La comparaison entre les flux métaboliques obtenus pour les deux lignées de lin permettra de mettre en évidence les voies/enzymes différentiellement impliquées dans la régulation des flux de carbone pour la synthèse des lipides et acides gras. Ces études serviront à identifier les redirections de flux de carbone vers la synthèse d'autres composés au détriment de la synthèse des lipides.

### **3.1. Optimisation de la culture des embryons, des extractions et de l'analyse des métabolites.**

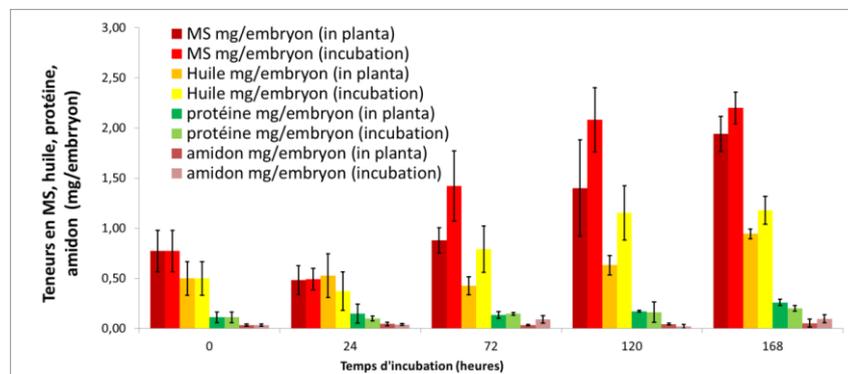
#### **3.1.1. Cinétique d'accumulation *in-vitro* et *in-planta*.**

Un protocole de culture, à l'obscurité, des embryons de lin a été développé durant la thèse de Troufflard (2004) afin d'étudier les précurseurs nécessaires à la synthèse des acides gras en utilisant la RMN *in-vivo*. Toutefois, les synthèses obtenues après culture des embryons de lin *in-vivo* n'ont pas été comparées aux synthèses effectuées par la plante au niveau de ses embryons. Afin de définir si les synthèses des composés de réserves dans les embryons en culture reflètent celles effectuées dans les embryons de lin *in-planta*, des embryons de lin âgés de 16 JAF ont été collectés, mis en culture dans une boîte de Pétri (Matériels et Méthodes, & 2.4.2.) et placés dans un phytotron durant 24, 72, 120, et 168 heures, sous une intensité lumineuse de  $20 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , à  $18^\circ\text{C}$  et avec une humidité de 60 %. Après incubation, les embryons ont été récupérés, lavés, lyophilisés. Le poids des embryons, les teneurs en lipides, protéines et amidon ont été déterminés (Matériels et Méthodes 2.2.1.) et comparés à ceux des embryons de lin âgés de 17, 19, 21 et 23 JAF (**Figure 56**).

Les résultats obtenus (**Figure 56**) montrent une augmentation du poids sec de l'embryon ( $0,8\pm 0,2$  mg de MS.embryon<sup>-1</sup> à T0 à  $2,2\pm 0,2$  mg de MS.embryon<sup>-1</sup> après 168 heures d'incubation), de la teneur en huile ( $0,5\pm 0,2$  mg d'huile.embryon<sup>-1</sup> à T0 à  $1,7\pm 0,5$  mg d'huile.embryon<sup>-1</sup> après 168 heures d'incubation), de la teneur en protéines ( $110\pm 50$  µg

de protéines.embryon<sup>-1</sup> à T0 à 200±30 µg de protéines.embryon<sup>-1</sup> après 168 heures d'incubation) et de la teneur en amidon (34±10 µg d'amidon.embryon<sup>-1</sup> à T0 à 98±40 µg d'amidon.embryon<sup>-1</sup> après 168 heures d'incubation). Les résultats sont statistiquement semblables à ceux déterminés dans les embryons âgés de 23 JAF (16 JAF + 168 h) cultivés en serre, puisque le poids sec de l'embryon est de 2,0±0,2 mg de MS.embryon<sup>-1</sup>, la teneur huile est de 1,2±0,3 mg d'huile.embryon<sup>-1</sup>, la teneur en protéine est de 260±32 µg de protéines.embryon<sup>-1</sup>, et la teneur en amidon de 54±40 µg de protéines.embryon<sup>-1</sup>.

Ainsi, dans les conditions de culture testées, les synthèses des différents composés de réserves dans les embryons cultivés *in-vitro* s'effectuent de la même manière que dans les embryons *in-planta*.



**Figure 56 : Teneurs en matière sèche (MS), en huile, en protéines et amidon dans les embryons âgés de 16 JAF incubés durant 24, 72, 120, 128 heures (embryons incubés), et dans les embryons âgés de 17, 19, 21 et 23 JAF (embryons *in planta*).**

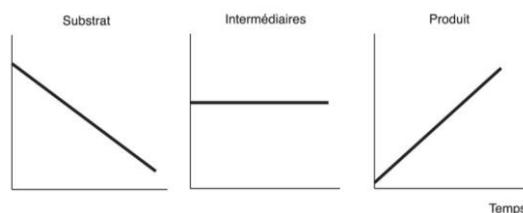
La quantification a été effectuée sur 30 embryons (10 embryons \* 3 répétitions biologiques).

Cette expérience a permis de valider notre protocole expérimental qui sera utilisé pour toutes les expériences réalisées ultérieurement.

### 3.1.2. Etat métabolique stationnaire.

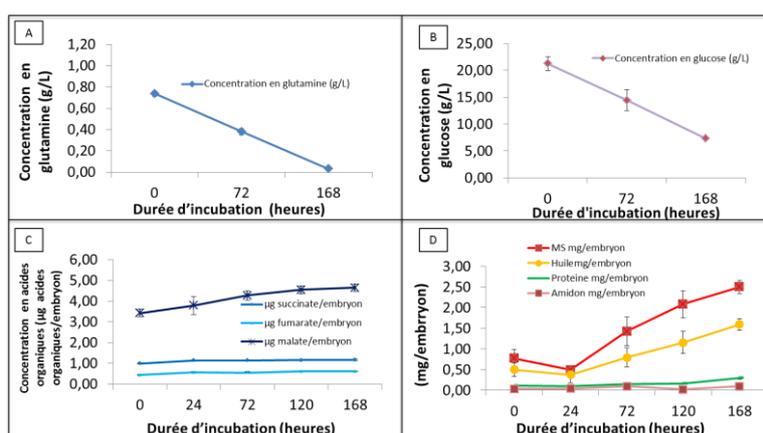
La quantification des flux métaboliques ne peut se faire que lorsque l'état métabolique stationnaire a été atteint dans les embryons de lin cultivés *in-vitro*. Cet état est atteint lorsqu'il y a une consommation de substrats et une accumulation des produits s'effectuant à vitesse constante. Dans ce cas, la concentration des intermédiaires ne change pas et les vitesses de synthèse de ces composés sont considérées comme égales à 0 (Figure 57).

Pour définir la date à laquelle les embryons de lin atteignent l'état métabolique stationnaire, un suivi des teneurs en glucose et en glutamine du milieu de culture (substrats des embryons), de la concentration des acides organiques (intermédiaires métaboliques) et des teneurs en huiles, protéines, amidon (produits) a été effectué dans des embryons incubés pendant 24, 72, 120 et 168 heures. Pour cela, des embryons de lin âgés de 16 JAF ont été prélevés, mis en culture dans une boîte de Pétri en présence de glucose (100 mM) et de glutamine (800 mg/L) non marqués (Matériels et Méthodes & 2.4.2.).



**Figure 57 : Condition des composés à l'état stationnaire métabolique, d'après Dieuaide-Noubhani *et al.* (2004).**

L'incubation a été effectuée dans un phytotron durant 24, 72, 120 et 168 heures, sous une intensité lumineuse de  $20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , à  $18^\circ\text{C}$  et avec une humidité de 60 %. Après incubation, les embryons ont été utilisés pour déterminer la teneur en intermédiaires métaboliques (acides organiques) ainsi que la teneur en produits (huile, protéines, amidon) et la matière sèche. Trois répétitions biologiques ont été effectuées par point de cinétique (10 embryons \* 3). Le milieu de culture a été récupéré à chaque point de cinétique et les teneurs en glucose et glutamine ont été quantifiés.



**Figure 58 : Evolution de la teneur en substrats, intermédiaires métaboliques et produits entre 0 et 168 heures d'incubation.**

A : Evolution de la concentration en glutamine ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) dans le milieu de culture au cours de l'incubation ; B : Evolution de la concentration en glucose ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) dans le milieu de culture au cours de l'incubation ; C : Evolution de la concentration en acides organiques ( $\mu\text{g} \cdot \text{embryon}^{-1}$ ) dans les embryons au cours de l'incubation ; D : Evolution de la MS, teneur en huile, protéines, amidon ( $\mu\text{g} \cdot \text{embryon}^{-1}$ ) au cours de l'incubation. La quantification a été effectuée sur 30 embryons (10 embryons \* 3 répétitions biologiques).

Les résultats (**Figure 58 A, B**) montrent une diminution de la teneur en glucose passant de  $21 \pm 1 \text{ g.L}^{-1}$  (T0) à  $7,3 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$  à 168 heures d'incubation et en glutamine évoluant de  $0,74 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$  à  $0,03 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$  à 168 heures d'incubation. Ces résultats indiquent la consommation de ces composés. La vitesse de consommation du glucose est de  $387 \pm 40 \text{ nmol de glucose.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$  et la vitesse de consommation de la glutamine est de  $26 \pm 6 \text{ nmol de glutamine.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ .

Les teneurs en succinate et en fumarate (**Figure 58 C**) augmentent jusqu'à 24 heures d'incubation passant de  $1,00 \pm 0,02 \text{ }\mu\text{g.embryon}^{-1}$  (T0) à  $1,15 \pm 0,01 \text{ }\mu\text{g}$  de succinate à 24 heures et de  $0,45 \pm 0,01 \text{ }\mu\text{g.embryon}^{-1}$  (T0) à  $0,57 \pm 0,03 \text{ }\mu\text{g}$  de fumarate.embryon<sup>-1</sup>. Les teneurs de ces deux composés restent stables après 24 heures et jusqu'à 168 heures d'incubation, indiquant une vitesse nulle de synthèse pour ces composés à partir de 24 heures d'incubation. La teneur en malate augmente jusque 120 heures d'incubation passant de  $3,43 \text{ }\mu\text{g.embryon}^{-1}$  à T0 à  $4,6 \pm 0,2 \text{ }\mu\text{g.embryon}^{-1}$  (**Figure 58 C**). La vitesse de synthèse de ces composés organiques est stable après 120 heures d'incubation.

L'analyse de la teneur des produits synthétisés, a montré une augmentation durant la période d'incubation (**Figure 58 D**) :

- de la matière sèche ( $0,8 \pm 0,2 \text{ mg de MS par embryon à T0 à } 2,5 \pm 0,2 \text{ mg de MS par embryon à T168}$ ).
- de la teneur en huile ( $0,5 \pm 0,2 \text{ mg d'huile par embryon à T0 à } 1,94 \text{ mg d'huile par embryon à T168}$ ).
- de la teneur en protéines ( $0,11 \pm 0,05 \text{ mg de protéine par embryon à T0 à } 0,26 \text{ mg d'huile par embryon à T168}$ ).
- de la teneur en amidon ( $0,03 \pm 0,01 \text{ mg d'amidon par embryon à T0 à } 0,10 \pm 0,04 \text{ mg d'amidon à T168}$ ).

Dans ces conditions de culture, l'état métabolique stationnaire est donc atteint dès 120 heures d'incubation, lorsque les concentrations en intermédiaires métaboliques deviennent constantes.

D'autres auteurs ont incubé des embryons dans un milieu de culture mimant les conditions de culture *in-planta* (Schwender *et al.*, 2003 ; Schwender *et al.*, 2006 ; Lonien et

Schwender, 2009 ; Allen *et al.*, 2009 ; Alonso *et al.*, 2007 ; 2010)(**Tableau XXII**). Nous avons montré que la vitesse de consommation du glucose dans le milieu de culture de lin est supérieure à celle des embryons de maïs (Alonso *et al.*, 2010) et inférieure à celle des embryons de tournesol et de soja (Allen *et al.*, 2009 ; Alonso *et al.*, 2007). La vitesse de consommation de la glutamine ( $26 \pm 6$  nmol de glutamine.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>) dans le milieu de culture des embryons de lin est inférieure à la consommation de glutamine dans les embryons de maïs, tournesol et soja (**Tableau XXII**).

**Tableau XXII : Vitesse de consommation du glucose et de la glutamine après incubation des embryons de soja, de tournesol, de maïs.**

Plante	Consommation de glucose nmol.h <sup>-1</sup> .embryon <sup>-1</sup>	Consommation de glutamine nmol.h <sup>-1</sup> .embryon <sup>-1</sup>	Références
Embryons de soja	704 ± 125	596 ± 2	Allen <i>et al.</i> , 2009
Embryons de tournesol	547 ± 2	80 ± 2	Alonso <i>et al.</i> , 2007
Embryons de maïs	238 ± 13	47 ± 2	Alonso <i>et al.</i> , 2010

Ces résultats montrent que l'importation de glucose et de glutamine dans les embryons de lin est inférieure à celle observée dans d'autres embryons photosynthétiques (tournesol et soja) mais reste toutefois dans le même ordre de grandeur. Les vitesses de consommation de la glutamine et du glucose dans les embryons de colza et *d'Arabidopsis thaliana* n'ont pu être comparées puisque les auteurs de ces publications ont évalué leurs consommations de substrats en nmol.h<sup>-1</sup>.mgMF<sup>-1</sup>. La concentration en intermédiaires métaboliques n'a pas été explicitement publiée dans les embryons de ces plantes. Toutefois, Lonien et Schwender (2009) soulignent dans leur publication que l'état métabolique stationnaire dans les embryons *d'Arabidopsis thaliana* était atteint à 5 jours.

### **3.1.3. Optimisation de l'extraction et de l'analyse des métabolites - Etat isotopique stationnaire des embryons de lin.**

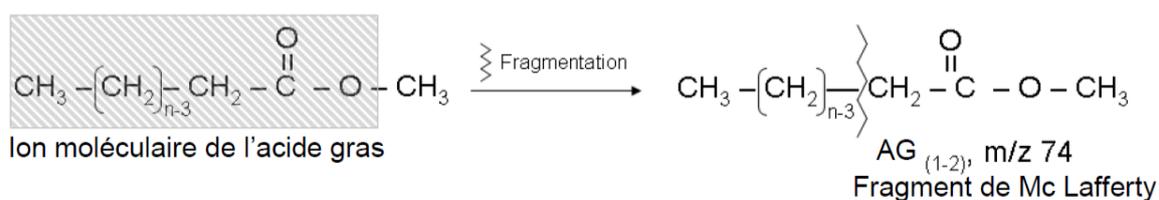
Afin de mesurer les enrichissements isotopiques en <sup>13</sup>C, il faut définir la date où l'état isotopique stationnaire est atteint pour les différents métabolites. Une étape d'optimisation d'extraction de ces métabolites à partir des matrices végétales est nécessaire. Les méthodes d'extractions mises au point dans ce travail ont été précisées dans la partie matériels et

méthodes (Matériels et Méthodes, & 2.2.4). Dans un premier temps, les analyses des enrichissements isotopiques des sucres libres, acides aminés, acides organiques, amidon et esters méthyliques d'acides gras ont été faites par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (EI-QQQ).

Pour définir la date où l'état isotopique stationnaire est atteint, un suivi des enrichissements isotopiques a été effectué avec des embryons de lin incubés dans le milieu de culture (Matériels et Méthodes, & 2.4.2.) et contenant 20 % de glucose [U-13C<sub>6</sub>] et 20 % de glutamine [13C<sub>5</sub>]. Les incubations ont eu lieu durant 24, 72, 120 et 168 heures.

### 3.1.3.1. Analyse des acides gras.

Afin de déterminer les enrichissements isotopiques des acides gras dans les embryons de lin, les esters méthyliques d'acides gras ont été analysés. La méthode utilisée est décrite dans la partie Matériel et Méthodes (& 2.2.2). L'injection de standards d'esters méthyliques d'acides gras a permis de déterminer les différents acides gras présents chez le lin (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3) (**Figure 60 A, B, C, D**). Dans ces conditions, les différents acides gras sont correctement séparés mais le type d'ionisation étant de haute énergie (Impact électronique), l'accès à l'ion moléculaire n'est pas possible (**Figure 60 E, F**). Toutefois, pour les acides gras saturés (C16:0, C18:0), le pic de base en m/z 74 correspondant au fragment de Mc Lafferty peut être exploité (**Figure 59, 60**).

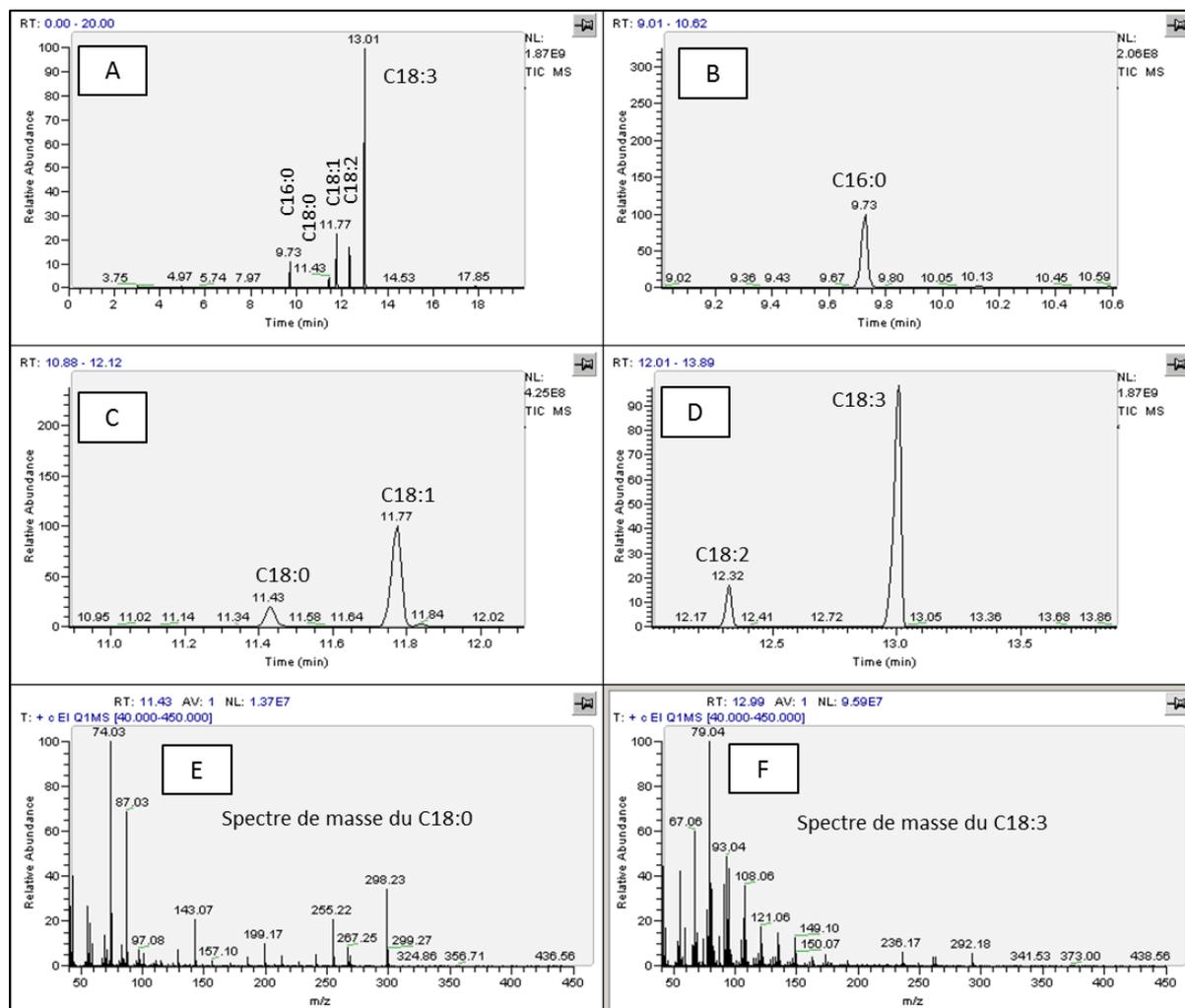


**Figure 59 : Obtention du fragment de Mc Lafferty après fragmentation des esters méthyliques d'acides gras.**

AG(1,2) : carbones 1 et 2 de l'acide gras

L'analyse des enrichissements du fragment de Mc Lafferty contenant 2 carbones de la molécule, correspond directement à la molécule d'acétyl-CoA incorporée à l'acide gras. L'exploitation du fragment de Mc Lafferty rend l'exploitation de l'ion moléculaire superflue puisqu'à chaque cycle d'élongation une molécule d'acétyl-CoA est incorporée. Le fait d'analyser tous les carbones de la molécule donne une valeur moyenne d'enrichissement et l'intégration de l'enrichissement pour l'ensemble des carbones génère des matrices de

dimensions très importantes et peu résolutive pour le calcul de flux. L'analyse du spectre de masse des acides gras insaturés (C18:1 ; C18:2 ; C18:3) n'a pas permis de trouver un fragment exploitable pour l'analyse des flux métaboliques. Cette information est inutile puisque les enrichissements sont déjà connus en exploitant le fragment de Mc Lafferty du C16:0 ; C18:0.



**Figure 60 : Chromatogrammes et spectres de masse de standards d'esters méthyliques d'acides gras.**

A : Chromatogramme de l'ensemble des standards d'acides gras (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3) ; B : Chromatogramme du C16:0 ; C : Chromatogramme du C18:0 et du C18:1 ; D : Chromatogramme du C18:2 et du C18:3 ; E : Spectre de masse du C18:0 ; F : Spectre de masse du C18:3.

L'analyse des spectres de masse du C16:0 et du C18:0 d'embryons de lin incubés durant 24, 72, 120 et 168 heures dans un milieu de culture contenant 20% de glucose marqué [U- $^{13}\text{C}_6$ ] et 20% de glutamine marquée [U- $^{13}\text{C}_5$ ] montre des enrichissements d'un carbone 13 (m+1) et de deux carbones 13 (m+2) pour les deux derniers carbones de ces composés. Cet enrichissement augmente jusque 120 heures (**Tableau XXIII**). Dans ces conditions

expérimentales, l'état isotopique stationnaire est atteint après 120 heures d'incubation. Pour l'analyse de flux, les données expérimentales utilisées seront celles acquises avec cette période d'incubation de 120 heures.

**Tableau XXIII : Evolution des enrichissements en  $^{13}\text{C}$  des deux derniers carbones de l'acide palmitique (C16:0) et de l'acide stéarique (C18:0) durant 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation.**

C16:0 Fragment de Mc Lafferty										
	16 JAF (T0)		16 JAF + 24h d'incubation		16 JAF + 72h d'incubation		16 JAF + 120h d'incubation		16 JAF + 168h d'incubation	
	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC
m0	1,00	0,00	0,84	0,06	0,71	0,04	0,57	0,02	0,57	0,01
m+1	0,00	0,00	0,12	0,05	0,17	0,03	0,23	0,02	0,21	0,03
m+2	0,00	0,00	0,04	0,00	0,12	0,01	0,21	0,00	0,22	0,03
Somme	1,00		1,00		1,00		1,00		1,00	
EM	0,00	0,00	0,10	0,03	0,20	0,03	0,32	0,01	0,33	0,01
C18:0 Fragment de Mc Lafferty										
	16 JAF (T0)		16 JAF + 24h d'incubation		16 JAF + 72h d'incubation		16 JAF + 120h d'incubation		16 JAF + 168h d'incubation	
	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC
m0	1,00	0,00	0,95	0,03	0,90	0,02	0,83	0,01	0,79	0,05
m+1	0,00	0,00	0,04	0,03	0,06	0,02	0,09	0,01	0,11	0,03
m+2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,08	0,00	0,10	0,01
Somme	1,00		1,00		1,00		1,00		1,00	
EM	0,00	0,00	0,02	0,02	0,07	0,01	0,12	0,03	0,16	0,03

L'extraction et la détermination des enrichissements isotopiques des esters méthyliques d'acides gras ont été effectuées sur 30 embryons (10 embryons \* 3 répétitions biologiques). EM : enrichissement moyen. EC : écart-type.

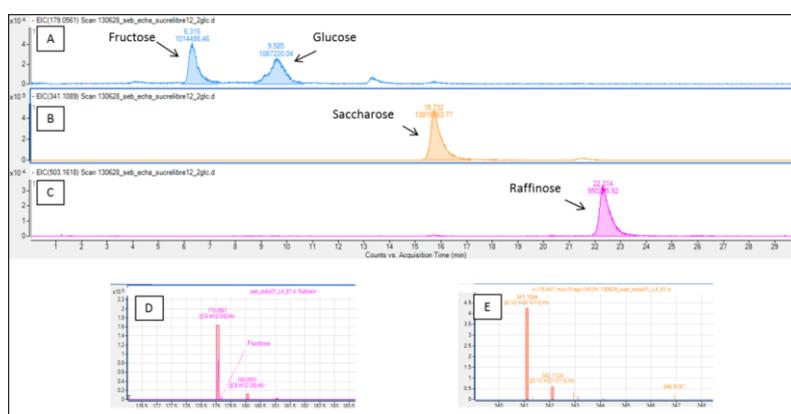
L'enrichissement moyen en carbone 13 des deux carbones du fragment de Mc Lafferty C16:0 est évalué à 32,6 %. L'enrichissement des deux carbones du fragment de Mc Lafferty du C18:0 est plus faible (15,5 %) que l'enrichissement moyen du C16:0 (**Tableau XXIII**). Dans ces expériences, cet enrichissement est directement du à l'incorporation soit du glucose marqué soit de la glutamine marquée. La discrimination existante entre les deux, se fera par l'incubation spécifique d'embryons en présence soit de glucose marqué, soit de glutamine marquée.

Suite à ces analyses, des problèmes liés à l'utilisation de la GC-MS ont pu être identifiés. En effet, le problème provient du type d'ionisation utilisé (EI) au niveau du spectromètre de masse qui génère de nombreux fragments difficilement identifiables pour l'analyse des flux métaboliques. Si certains fragments sont utilisables pour l'analyse des flux métaboliques tel

que le fragment de Mc lafferty pour les acides gras saturés, l'utilisation de cette technique pour l'analyse d'autres composés comme les sucres a montré qu'avec ce type d'ionisation, le risque de chevauchement entre les gammes de masse des isotopomères des différents fragments est important engendrant une exploitation des fragments impossible pour l'analyse des flux métaboliques (Koubaa *et al.*, 2013 ; 2014). Pour limiter ces problèmes, des techniques ont été développées, au sein du laboratoire, permettant de séparer tous les métabolites à tester avec une ionisation douce au niveau de la source du spectromètre de masse pour limiter les fragments et les chevauchements entre les gammes de masse des isotopomères. Ainsi, l'HRLC-MS (ESI-QTOF) a été utilisé pour doser les acides organiques, les sucres et l'amidon, l'EC-MS (ESI-QTOF) pour doser les acides aminés libres.

### 3.1.3.2. Analyse des sucres libres.

Les enrichissements isotopiques des sucres libres ont été déterminés par l'utilisation d'une méthode d'analyse HRLC-MS (ESI-QTOF) permettant de séparer ces composés et d'obtenir directement le massif isotopique ( $M-H^+$ ) de chaque composé (Matériel et Méthodes, &2.4.4.3.2). L'injection de standards a permis de confirmer la séparation des différents sucres libres (fructose, glucose, saccharose, maltose, raffinose). Le fructose ( $M-H^+$  : 179,0561) est élué à 6,26 minutes, le glucose ( $M-H^+$  : 179,0561) à 9,55 minutes, le saccharose ( $M-H^+$  : 341,1089) à 15,74 minutes et le raffinose ( $M-H^+$  : 503,1618) à 22,35 minutes (**Figure 61**). Dans la fraction soluble extraite par le protocole d'extraction séquentielle (Matériels et Méthodes, & 2.4.4.), trois sucres libres ont été trouvés (le fructose, le glucose, le saccharose).



**Figure 61 : Chromatogrammes et spectres de masse de la fraction soluble contenant les sucres libres.**

A : Chromatogramme du glucose et du fructose ; B : Chromatogramme du saccharose ; C : Chromatogramme du raffinose ; D : Spectre de masse du fructose ; E : Spectre de masse du saccharose.

Pour déterminer la date où les enrichissements isotopiques de ces sucres libres restent stables, l'analyse des massifs isotopiques ( $M-H^+$ ) de chaque composé a été effectuée dans la fraction soluble extraite d'embryons de lin incubés durant 24, 72, 120 et 168 heures en présence de 20 % de glutamine [ $U-^{13}C_5$ ] et 20 % de glucose [ $U-^{13}C_6$ ].

L'analyse des enrichissements isotopiques des trois sucres libres montre une augmentation de l'intensité des isotopomères de masse (**Tableau XXIV, XXV**) accompagnée d'une diminution du fragment ( $M-H^+ : m_0$ ).

**Tableau XXIV : Evolution des enrichissements en  $^{13}C$  du  $M-H^+$  du glucose et du fructose durant 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation.**

Glucose ( $M-H^+$ )										
	16 JAF (T0)		16 JAF + 24h d'incubation		16 JAF + 72h d'incubation		16 JAF + 120h d'incubation		16 JAF + 168h d'incubation	
	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC
m0	1,00	0,00	0,69	0,08	0,73	0,04	0,75	0,01	0,73	0,03
m+1	0,00	0,00	0,03	0,01	0,05	0,01	0,05	0,01	0,05	0,02
m+2	0,00	0,00	0,12	0,10	0,04	0,01	0,03	0,01	0,04	0,01
m+3	0,00	0,00	0,04	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01
m+4	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
m+5	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
m+6	0,00	0,00	0,11	0,03	0,11	0,01	0,12	0,01	0,12	0,01
Somme	1,00		1,00		1,00		1,00		1,00	
EM	0,00	0,00	0,18	0,01	0,17	0,02	0,17	0,01	0,18	0,01
Fructose ( $M-H^+$ )										
	16 JAF (T0)		16 JAF + 24h d'incubation		16 JAF + 72h d'incubation		16 JAF + 120h d'incubation		16 JAF + 168h d'incubation	
	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC
m0	1,00	0,00	0,74	0,05	0,67	0,01	0,67	0,01	0,64	0,01
m+1	0,00	0,00	0,05	0,01	0,07	0,01	0,07	0,01	0,09	0,01
m+2	0,00	0,00	0,04	0,01	0,05	0,01	0,06	0,01	0,06	0,01
m+3	0,00	0,00	0,08	0,02	0,09	0,01	0,08	0,01	0,08	0,01
m+4	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01
m+5	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
m+6	0,00	0,00	0,08	0,01	0,08	0,01	0,09	0,01	0,09	0,01
Somme	1,00		1,00		1,00		1,00		1,00	
EM	0,00	0,00	0,15	0,02	0,18	0,01	0,18	0,01	0,19	0,01

L'extraction et la détermination des enrichissements isotopiques des sucres libres ont été effectuées sur 30 embryons (10 embryons \* 3 répétitions biologiques). EM : enrichissement moyen. EC : écart-type.

Pour le glucose et à partir de 24 heures d'incubation, les isotopomères de masse restent stables. Pour ces composés, l'état isotopique stationnaire est atteint après seulement 24 heures d'incubation (**Tableau XXIV, XXV**). En effet, le glucose présent dans l'embryon a été enrichi en ses 6 carbones en  $^{13}\text{C}$  (m+6) de 12 %, mais également au niveau d'un carbone (m+1) de 5 %, de deux carbones (m+2) de 3,2 %, de trois carbones (m+3) de 4,2 % (**Tableau XXIV**).

**Tableau XXV : Evolution des enrichissements en  $^{13}\text{C}$  du M-H<sup>+</sup> du saccharose durant 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation.**

Saccharose										
	16 JAF (T0)		16 JAF + 24h d'incubation		16 JAF + 72h d'incubation		16 JAF + 120h d'incubation		16 JAF + 168h d'incubation	
	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC
m0	1,00	0,00	0,52	0,01	0,44	0,01	0,45	0,03	0,42	0,01
m+1	0,00	0,00	0,08	0,01	0,10	0,01	0,12	0,02	0,13	0,02
m+2	0,00	0,00	0,06	0,01	0,08	0,01	0,04	0,02	0,09	0,01
m+3	0,00	0,00	0,12	0,01	0,12	0,00	0,14	0,02	0,12	0,01
m+4	0,00	0,00	0,02	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01
m+5	0,00	0,00	0,02	0,01	0,03	0,01	0,03	0,01	0,03	0,01
m+6	0,00	0,00	0,13	0,01	0,13	0,01	0,13	0,01	0,12	0,02
m+7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01
m+8	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
m+9	0,00	0,00	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01
m+10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
m+11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
m+12	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Somme	1,00		1,00		1,00		1,02		1,00	
EM	0,00	0,00	0,16	0,01	0,18	0,01	0,18	0,01	0,18	0,01

L'extraction et la détermination des enrichissements isotopiques des sucres libres ont été effectuées sur 30 embryons (10 embryons \* 3 répétitions biologiques). EM : enrichissement moyen. EC : écart-type.

Or, le glucose présent dans le milieu de culture et non marqué a été enrichi exclusivement de 20 % en  $^{13}\text{C}$  au niveau de ses 6 carbones (m+6). La différence d'enrichissement entre le glucose présent dans le milieu de culture et le glucose présent dans l'embryon pourrait s'expliquer par l'implication de la participation de la glutamine à l'enrichissement du glucose. Dans nos expériences, la glutamine marquée est aussi présente dans le milieu de culture et pourrait contribuer à l'enrichissement en carbone des sucres libres. Dans ce cas, une néoglucogenèse pourrait expliquer que l'enrichissement isotopique du glucose n'est pas semblable à celui observé dans le glucose contenu dans le milieu de culture. Une analyse des enrichissements des sucres libres et plus spécifiquement du glucose

après incubation des embryons exclusivement avec de la glutamine  $^{13}\text{C}_5$  pourrait déterminer cela.

Pour le fructose et le saccharose, une diminution de leur  $\text{M-H}^+$  est également observée et corrélée à une augmentation des isotopomères de masse (**Tableau XXIV, XXV**). L'enrichissement isotopique du fructose est similaire à celui du glucose présentant un enrichissement des 6 carbones du  $\text{M-H}^+$  de 10 %.

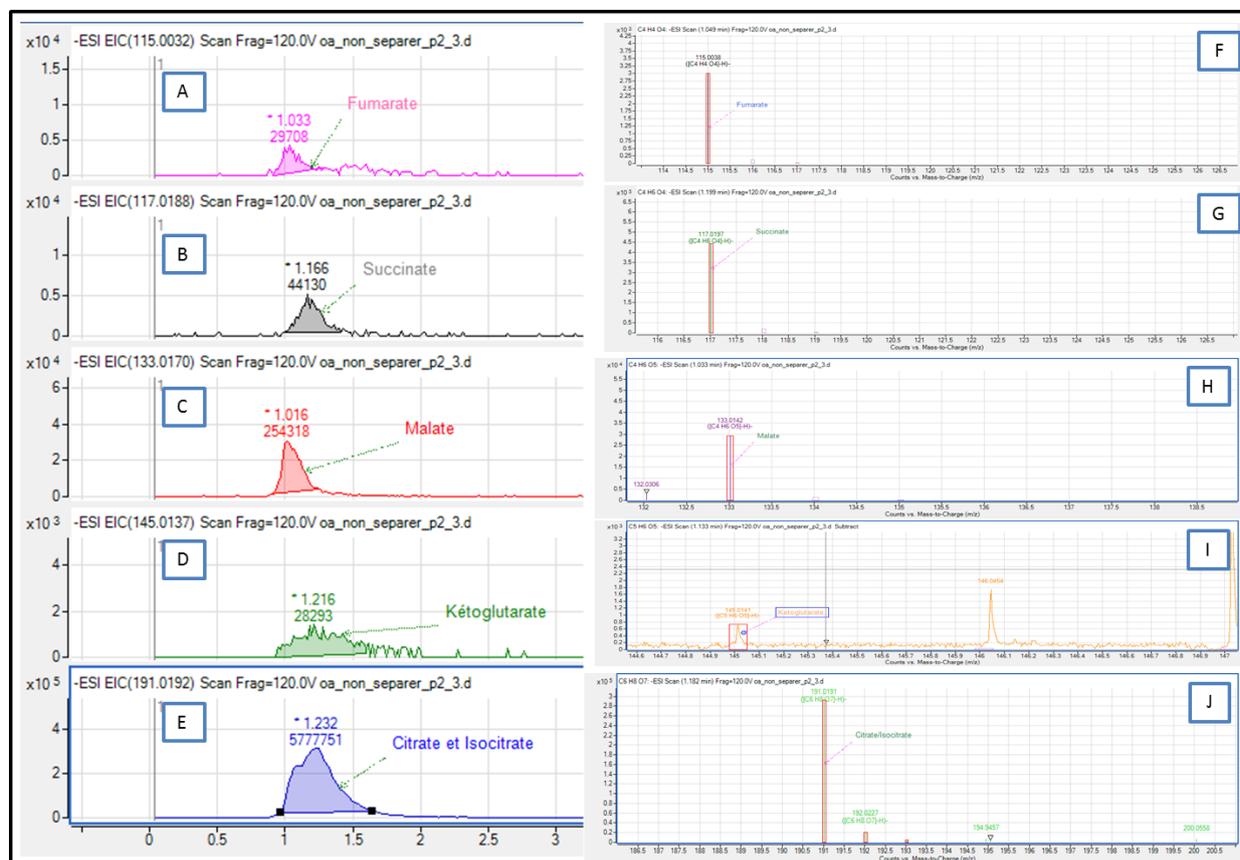
Le saccharose est majoritairement enrichi de 12 % au niveau de 6 carbones ( $m+6$ ) et pourrait correspondre à l'enrichissement soit du fructose ou du glucose. Bien qu'il y ait un échange permanent entre le glucose, fructose et saccharose, l'ensemble des isotopomères de masses des sucres libres est stable dès 72 heures d'incubation.

Les enrichissements moyens obtenus sont de 20 % (**Tableau XXIV, XXV**). Dans les conditions de l'expérience, l'enrichissement en carbone 13 des différents sucres libres pourrait provenir à la fois des carbones marqués du glucose et/ou de ceux de la glutamine présents dans le milieu de culture. Afin de connaître l'origine de ces enrichissements, une incubation en présence de glutamine marquée [ $\text{U-}^{13}\text{C}_5$ ] sera réalisée pour valider cette hypothèse.

#### 3.1.3.3. Analyse des composés organiques.

Les enrichissements isotopiques des acides organiques ont été déterminés par utilisation d'une méthode d'analyse HRLC-MS (ESI-QTOF) permettant la séparation des composés et l'obtention du massif isotopique de ( $\text{M-H}^+$ ) de chaque composé (Matériel et Méthodes &2.4.3.2). Pour cela, une solution de malate, cétooglutarate, succinate, fumarate, citrate et isocitrate (10  $\mu\text{g/mL}$ ) a été injectée dans l'HRLC-MS (ESI-QTOF) (Matériels et Méthodes &2.4.3.2) de manière à déterminer leur séparation selon les conditions d'analyse. Le malate ( $\text{M-H}^+$  : 133,0137), le cétooglutarate ( $\text{M-H}^+$  : 145,0137), le succinate ( $\text{M-H}^+$  : 117,0188), le fumarate ( $\text{M-H}^+$  : 115,0032) et la citrate/isocitrate ( $\text{M-H}^+$  : 191,0192) ont été identifiés à des temps de rétention (**Figure 62**) respectivement de 0,99 minute, 1,12 minute, 1,08 minute, 1,03 minute. Dans la fraction soluble extraite à partir d'embryons de lin âgés de 16 JAF, les différents acides organiques ont tous été détectés. Toutefois l'intensité du pic du cétooglutarate est insuffisante pour avoir accès au  $m+1$ ,  $m+2$   $m+3$  du  $\text{M-H}^+$ .

Le massif isotopique M-H<sup>+</sup> des acides organiques des embryons de lin âgés de 16 JAF et cultivés durant 24, 72, 120 et 168 heures dans un milieu de culture contenant du 20 % de glucose marqué ([U-13C<sub>6</sub>] glucose) et 20 % de glutamine marqué ([U-13C<sub>5</sub>] glutamine) a été analysé (**Tableau XXVI**).



**Figure 62 : Chromatogrammes et spectres de masse de la fraction soluble contenant les acides organiques.**

A : Chromatogramme du fumarate ; B : Chromatogramme du succinate ; C : Chromatogramme du malate ; D : Chromatogramme du kétoglutarate ; E : Chromatogramme du citrate/isocitrate ; F : Spectre de masse du fumarate ; G : Spectre de masse de succinate ; H : Spectre de masse du malate ; I : Spectre de masse du kétoglutarate ; J : Spectre de masse du citrate/isocitrate

Une augmentation des pics du m+1, m+2, m+n de chaque M-H<sup>+</sup> des différents acides organiques a été enregistrée jusque 72 heures d'incubation pour le citrate/isocitrate, le succinate et le fumarate. Les isotopomères de masse du M-H<sup>+</sup> du malate sont stables dès 24 h d'incubation. Les enrichissements moyens de ces acides organiques sont très proches (13 %). En effet, le malate est en équilibre avec le fumarate, qui, à son tour, est en équilibre avec le succinate, qui est en équilibre avec la citrate/isocitrate. Pour chaque acide organique, un ou deux carbones (m+1 et m+2) ont été enrichis (**Tableau XXVI**).

**Tableau XXVI : Evolution des enrichissements en  $^{13}\text{C}$  du  $\text{M-H}^+$  des acides organiques durant 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation.**

Citrate/Isocitrate ( $\text{M-H}^+$ )										
	16 JAF (T0)		16 JAF + 24h d'incubation		16 JAF + 72h d'incubation		16 JAF + 120h d'incubation		16 JAF + 168h d'incubation	
	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC
m0	1,00	0,00	0,75	0,06	0,57	0,03	0,53	0,01	0,54	0,01
m+1	0,00	0,00	0,10	0,01	0,16	0,01	0,19	0,01	0,18	0,01
m+2	0,00	0,00	0,11	0,02	0,12	0,01	0,14	0,01	0,14	0,01
m+3	0,00	0,00	0,01	0,02	0,06	0,01	0,06	0,01	0,07	0,01
m+4	0,00	0,00	0,01	0,02	0,03	0,01	0,04	0,01	0,03	0,01
m+5	0,00	0,00	0,01	0,02	0,04	0,01	0,03	0,01	0,03	0,01
m+6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Somme	1,00		1,00		1,00		1,00		1,00	
EM	0,00	0,00	0,06	0,03	0,14	0,01	0,15	0,01	0,14	0,01
Succinate ( $\text{M-H}^+$ )										
	16 JAF (T0)		16 JAF + 24h d'incubation		16 JAF + 72h d'incubation		16 JAF + 120h d'incubation		16 JAF + 168h d'incubation	
	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC
m0	1,00	0,00	0,80	0,05	0,72	0,04	0,70	0,01	0,73	0,01
m+1	0,00	0,00	0,08	0,02	0,12	0,01	0,14	0,01	0,12	0,01
m+2	0,00	0,00	0,07	0,05	0,13	0,06	0,09	0,02	0,11	0,01
m+3	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01
m+4	0,00	0,00	0,03	0,03	0,04	0,02	0,07	0,01	0,03	0,01
Somme	1,00		1,00		1,00		1,00		1,00	
EM	0,00	0,00	0,08	0,02	0,11	0,01	0,12	0,01	0,09	0,01
Fumarate ( $\text{M-H}^+$ )										
	16 JAF (T0)		16 JAF + 24h d'incubation		16 JAF + 72h d'incubation		16 JAF + 120h d'incubation		16 JAF + 168h d'incubation	
	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC
m0	1,00	0,00	0,74	0,01	0,67	0,03	0,67	0,01	0,67	0,01
m+1	0,00	0,00	0,17	0,02	0,16	0,03	0,14	0,03	0,15	0,01
m+2	0,00	0,00	0,02	0,01	0,09	0,01	0,10	0,03	0,12	0,01
m+3	0,00	0,00	0,05	0,02	0,04	0,01	0,06	0,01	0,03	0,02
m+4	0,00	0,00	0,02	0,01	0,05	0,02	0,03	0,01	0,03	0,01
Somme	1,00		1,00		1,00		1,00		1,00	
EM	0,00	0,00	0,09	0,01	0,13	0,01	0,13	0,01	0,12	0,01

L'extraction et la détermination des enrichissements isotopiques des acides organiques ont été effectuées sur 30 embryons (10 embryons \* 3 répétitions biologiques). EM : enrichissement moyen. EC : Ecart type.

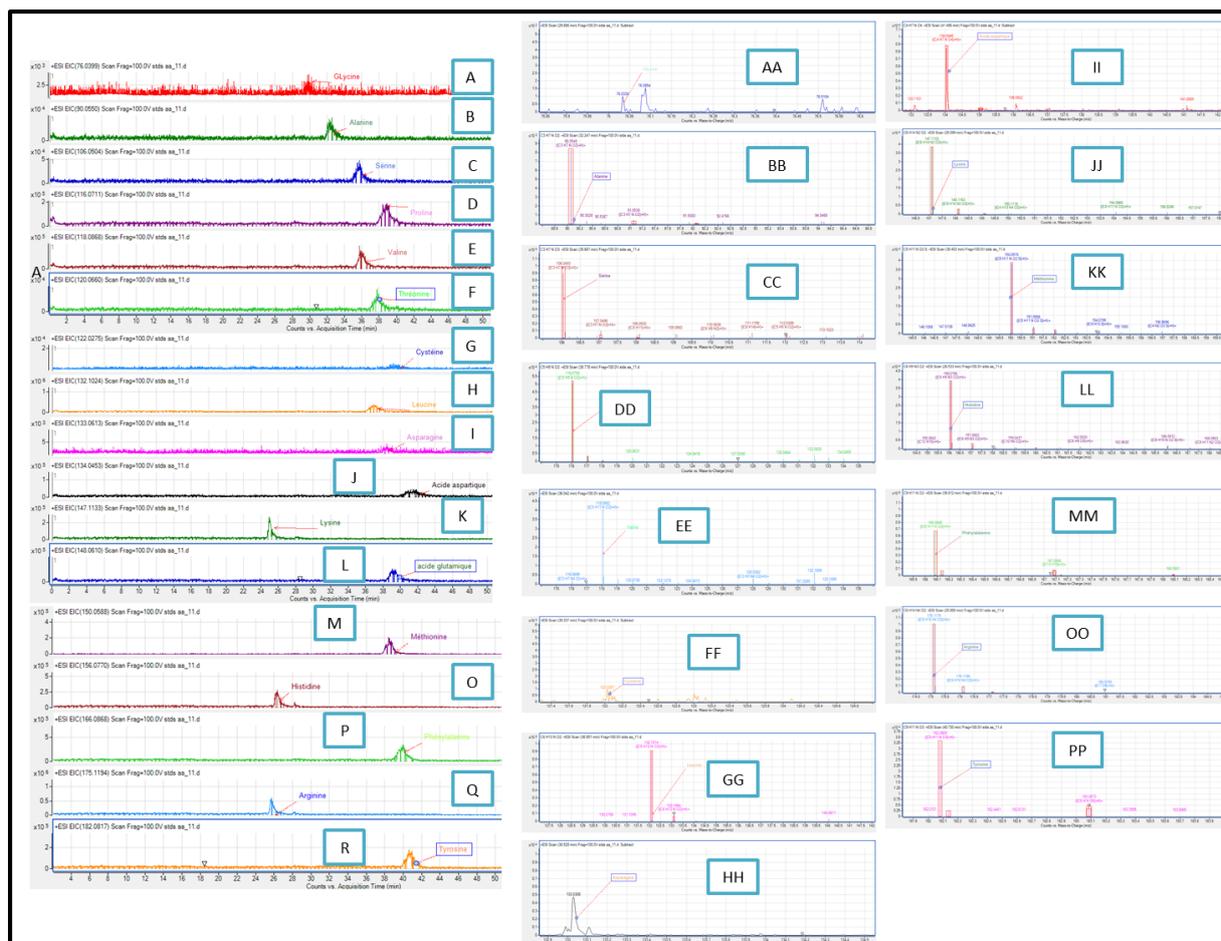
Malate										
	16 JAF (T0)		16 JAF + 24h d'incubation		16 JAF + 72h d'incubation		16 JAF + 120h d'incubation		16 JAF + 168h d'incubation	
	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC
m0	1,00	0,00	0,68	0,01	0,64	0,01	0,64	0,01	0,63	0,01
m+1	0,00	0,00	0,13	0,01	0,15	0,01	0,16	0,01	0,17	0,01
m+2	0,00	0,00	0,08	0,01	0,09	0,01	0,10	0,01	0,11	0,01
m+3	0,00	0,00	0,07	0,01	0,06	0,01	0,06	0,01	0,05	0,01
m+4	0,00	0,00	0,05	0,01	0,05	0,01	0,04	0,01	0,03	0,01
Somme	1,00		1,00		1,00		1,00		1,00	
EM	0,00	0,00	0,14	0,01	0,14	0,01	0,14	0,01	0,14	0,01

L'extraction et la détermination des enrichissements isotopiques des acides organiques ont été effectuées sur 30 embryons (10 embryons \* 3 répétitions biologiques). EM : enrichissement moyen. EC : écart-type.

A ce stade, il n'est pas possible de déterminer si les enrichissements en carbone 13 des acides sont présents sous forme marquée et non marquée dans le milieu de culture. Une analyse des enrichissements isotopiques des carbones de ces acides organiques après incubation des embryons dans un milieu de culture contenant exclusivement de la glutamine marqué U-13C<sub>5</sub> et une analyse des enrichissements isotopiques des carbones de ces acides organiques après incubation dans un milieu de culture contenant exclusivement du glucose marqué au carbone 13 pourraient définir la part de la glutamine et du glucose dans l'enrichissements de ces composés.

#### 3.1.3.4. Analyse des acides aminés libres.

L'analyse des enrichissements isotopiques des acides aminés libres de la fraction soluble a été déterminée par une méthode développée en EC-MS (ESI-TOF) (Matériel et Méthodes &2.4.4.3.4). Cette méthode a été utilisée pour séparer les 20 acides aminés sans procéder à leur dérivatisation tout en permettant l'obtention du massif isotopique (M+H<sup>+</sup>) pour chaque composé (**Figure 63**).



**Figure 63 : Chromatogrammes et spectres de masse de standards d'acides aminés.**

A : Chromatogramme de la glycine ; B : Chromatogramme de l'alanine ; C : Chromatogramme de la sérine ; D : Chromatogramme de la proline ; E : Chromatogramme de la valine ; F : Chromatogramme de la thréonine ; G : Chromatogramme de la cystéine ; H : Chromatogramme de la leucine ; I : Chromatogramme de l'asparagine ; J : Chromatogramme de l'acide aspartique ; K : Chromatogramme de lysine ; L : Chromatogramme de l'acide glutamique ; M : Chromatogramme de la méthionine ; O : Chromatogramme de l'histidine ; P : Chromatogramme de la phénylalanine ; Q : Chromatogramme de l'arginine ; R : Chromatogramme de la tyrosine ; AA : Spectre de masse de la glycine ; BB : Spectre de masse de l'alanine ; CC : Spectre de masse de sérine ; DD : Spectre de masse de proline ; EE : Spectre de masse de la valine ; FF : Spectre de masse de la cystéine ; GG : Spectre de masse de la leucine ; HH : Spectre de masse de l'asparagine ; II : Spectre de masse de l'acide aspartique ; JJ : Spectre de masse de la lysine ; KK : Spectre de masse de la méthionine ; LL : Spectre de masse de l'histidine ; MM : Spectre de masse de la phénylalanine ; OO : Spectre de masse de l'arginine ; PP : Spectre de masse de la tyrosine.

Dans la fraction soluble extraite d'embryons de lin âgés de 16 JAF, 5 acides aminés libres ont été détectés : la proline ( $M+H^+$  : 116,0711), la valine ( $M+H^+$  : 118,0868), l'asparagine ( $M+H^+$  : 133,0613), la lysine ( $M+H^+$  : 147,1133) et l'arginine ( $M+H^+$  : 175,1194). L'analyse des acides aminés libres de la fraction soluble extraite d'embryons de lin âgés de 16 JAF et cultivés durant 24, 72, 120 et 168 heures dans un milieu de culture contenant du 20 % de glucose marqué ( $[U-^{13}C_6]$  glucose) et 20 % de glutamine marquée ( $[^{13}C_5]$  glutamine) a montré une augmentation des enrichissements moyens jusque 72 heures d'incubation pour l'asparagine et la valine et jusque 120 heures d'incubation pour la proline, l'arginine et la lysine (Tableau XXVII ; Tableau XXVIII).

**Tableau XXVII : Evolution des enrichissements en  $^{13}\text{C}$  du  $\text{M}+\text{H}^+$  de la proline, et de l'arginine durant 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation.**

Proline ( $\text{M}+\text{H}^+$ )										
	16 JAF (T0)		16 JAF + 24h d'incubation		16 JAF + 72h d'incubation		16 JAF + 120h d'incubation		16 JAF + 168h d'incubation	
	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC
m0	1	0	ND		0,62	0,11	0,58	0,03	0,53	0,03
m+1	0	0	ND		0,14	0,04	0,16	0,03	0,18	0,01
m+2	0	0	ND		0,09	0,03	0,11	0,01	0,14	0,02
m+3	0	0	ND		0,04	0,01	0,05	0,01	0,08	0,03
m+4	0	0	ND		0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01
m+5	0	0	ND		0,10	0,01	0,08	0,01	0,05	0,02
Somme	1,00		ND		1,00		1,00		1,00	
EM proline	0,00	0,00	ND		0,10	0,02	0,17	0,01	0,17	0,01
Arginine ( $\text{M}+\text{H}^+$ )										
	16 JAF (T0)		16 JAF + 24h d'incubation		16 JAF + 72h d'incubation		16 JAF + 120h d'incubation		16 JAF + 168h d'incubation	
	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC
m0	1,00	0,00	0,72	0,12	0,62	0,10	0,64	0,01	0,62	0,03
m+1	0,00	0,00	0,18	0,05	0,21	0,04	0,18	0,01	0,19	0,01
m+2	0,00	0,00	0,02	0,01	0,06	0,02	0,06	0,01	0,07	0,02
m+3	0,00	0,00	0,01	0,01	0,03	0,02	0,03	0,01	0,04	0,01
m+4	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01
m+5	0,00	0,00	0,05	0,03	0,06	0,02	0,06	0,01	0,05	0,01
m+6	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01
Somme	1,00		1,00		1,00		1,00		1,00	
EM arginine	0,00	0,00	0,08	0,00	0,15	0,01	0,18	0,01	0,18	0,01

L'extraction et la détermination des enrichissements isotopiques des acides organiques ont été effectuées sur 30 embryons (10 embryons \* 3 répétitions biologiques). EM : enrichissement moyen. EC : écart-type.

L'analyse des enrichissements isotopiques des acides aminés provenant de la glutamine et du céto-glutarate, la proline et l'arginine, présentent des enrichissements isotopiques similaires (**Tableau XXVII ; Tableau XXVIII**). L'enrichissement de 5 carbones  $^{13}\text{C}$  de l'arginine et de la proline (m+5) est de 5 % et pourrait provenir de la glutamine marquée [ $\text{U-}^{13}\text{C}_5$ ] présent dans le milieu de culture. Toutefois la présence simultanée de la glutamine marquée et du glucose marqué dans le milieu de culture ne permet pas de définir l'origine de ces enrichissements isotopiques. L'analyse des enrichissements isotopiques du  $\text{M}+\text{H}^+$  de la lysine, l'asparagine et de la valine (**Tableau XXVIII**) a montré que les enrichissements sur

l'ensemble des carbones de la molécule pourraient indiquer que la glutamine et/ou le glucose marqués ont contribué à l'apport en carbone 13 pour ces molécules.

**Tableau XXVIII : Evolution des enrichissements en  $^{13}\text{C}$  du  $\text{M}+\text{H}^+$  de la lysine, de l'asparagine et de la valine durant 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation.**

Asparagine ( $\text{M}+\text{H}^+$ )										
	16 JAF (T0)		16 JAF + 24h d'incubation		16 JAF + 72h d'incubation		16 JAF + 120h d'incubation		16 JAF + 168h d'incubation	
	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC
M	1,00	0,00	0,79	0,02	0,73	0,01	0,79	0,05	0,85	0,03
M+1	0,00	0,00	0,09	0,02	0,14	0,01	0,10	0,03	0,15	0,01
M+2	0,00	0,00	0,12	0,04	0,13	0,01	0,09	0,03	0,09	0,03
Somme	1,00		1,00		1,00		0,98		1,09	
EM asparagine	0,00	0,00	0,11	0,02	0,13	0,01	0,14	0,01	0,14	0,00
Lysine ( $\text{M}+\text{H}^+$ )										
	16 JAF (T0)		16 JAF + 24h d'incubation		16 JAF + 72h d'incubation		16 JAF + 120h d'incubation		16 JAF + 168h d'incubation	
	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC
m0	1,00	0,00	0,81	0,02	0,62	0,19	0,59	0,12	0,58	0,05
m+1	0,00	0,00	0,13	0,06	0,22	0,06	0,17	0,01	0,19	0,01
m+2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,10	0,16	0,07	0,14	0,07
m+3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,08	0,04	0,09	0,01
Somme	1,00		0,94		0,95		1,00		1,00	
EM lysine	0,00	0,00	0,08	0,01	0,12	0,01	0,15	0,01	0,14	0,01
Valine ( $\text{M}+\text{H}^+$ )										
	16 JAF (T0)		16 JAF + 24h d'incubation		16 JAF + 72h d'incubation		16 JAF + 120h d'incubation		16 JAF + 168h d'incubation	
	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC
m0	1	0	0,57	0,09	0,74	0,15	0,76	0,06	0,75	0,03
m+1	0	0	0,22	0,03	0,16	0,01	0,15	0,02	0,16	0,02
m+2	0	0	0,15	0,02	0,01	0,01	0,06	0,01	0,06	0,01
m+3	0	0	0,06	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
m+4	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
m+5	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Somme	1,00		1,00		0,92		0,96		0,96	
EM valine	0,00	0,00	0,09	0,01	0,12	0,01	0,11	0,01	0,12	0,01

L'extraction et la détermination des enrichissements isotopiques des acides organiques ont été effectuées sur 30 embryons (10 embryons \* 3 répétitions biologiques). EM : enrichissement moyen. EC : écart-type.

### 3.1.3.5. Analyse de l'amidon.

L'amidon extrait après l'extraction de la fraction soluble a été dosé par la méthode développée pour le dosage des sucres libres (Matériel et Méthodes &2.2.5) après hydrolyse

de l'amidon en glucose. Le glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon extrait à partir d'embryons de lin âgés de 16 JAF incubés durant 24, 72, 120 et 168 heures dans le milieu de culture contenant 20 % de glucose marqué au [U-13C<sub>6</sub>] et 20 % de glutamine marquée [U-13C<sub>5</sub>], a été analysé pour évaluer l'enrichissement isotopique au cours du temps (**Tableau XXIX**).

**Tableau XXIX : Evolution des enrichissements en 13C du glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon durant 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation.**

Amidon (M-H <sup>+</sup> du glucose)										
	16 JAF (T0)		16 JAF + 24h d'incubation		16 JAF + 72h d'incubation		16 JAF + 120h d'incubation		16 JAF + 168h d'incubation	
	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC
m0	1,00	0,00	0,77	0,01	0,71	0,01	0,74	0,02	0,71	0,04
m+1	0,00	0,00	0,00	0,05	0,06	0,01	0,08	0,02	0,07	0,01
m+2	0,00	0,00	0,22	0,08	0,06	0,01	0,06	0,01	0,06	0,01
m+3	0,00	0,00	0,01	0,01	0,06	0,01	0,05	0,01	0,06	0,01
m+4	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03
m+5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
m+6	0,00	0,00	0,01	0,02	0,08	0,01	0,06	0,01	0,07	0,02
Somme	1,00		1,00		1,00		1,00		1,00	
EM	0,00	0,00	0,11	0,03	0,16	0,01	0,13	0,02	0,15	0,04

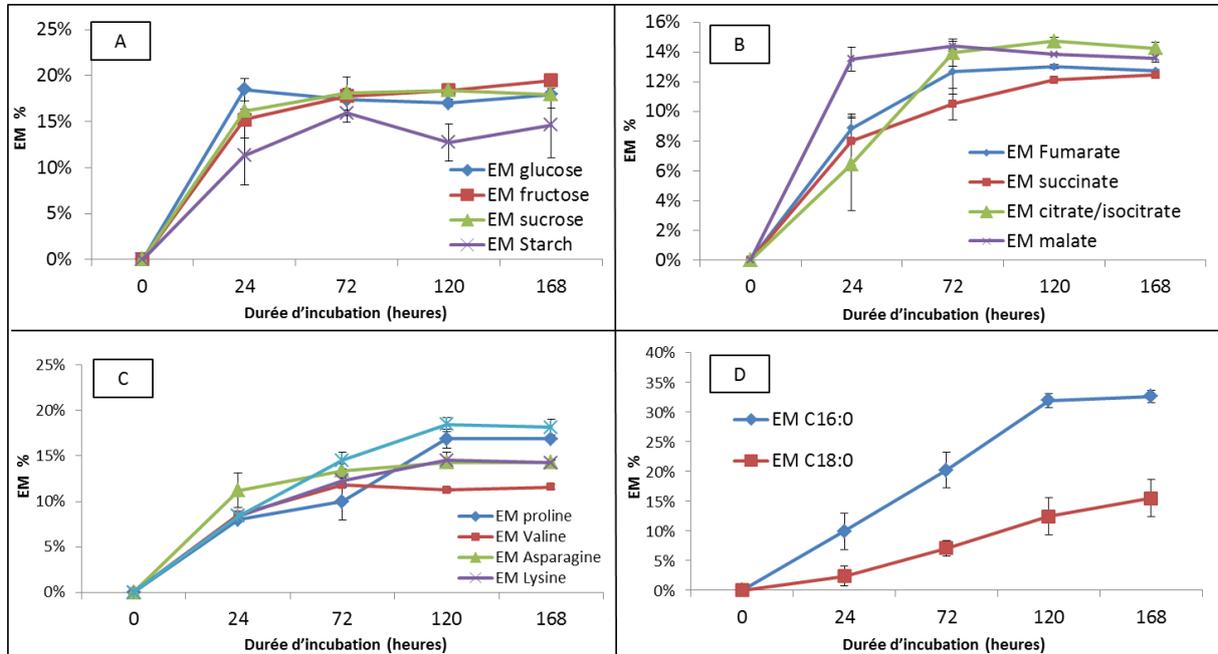
L'extraction et la détermination des enrichissements isotopiques des acides organiques ont été effectuées sur 30 embryons (10 embryons \* 3 répétitions biologiques). EM : enrichissement moyen. EC : écart-type.

L'analyse du spectre du massif isotopique du M-H<sup>+</sup> indique que l'enrichissement moyen du glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon augmente jusqu'à 72 heures d'incubation (**Tableau IX**) pour atteindre 18 %. L'analyse de l'enrichissement du glucose a également montré un enrichissement des 6 carbones (m+6) de 7 % qui pourrait provenir du glucose présent dans le milieu de culture, mais également des carbones de la glutamine. L'analyse des enrichissements du glucose provenant de l'amidon a également montré un enrichissement d'un carbone 13 (m+1) de 7 % et de deux carbones 13 (m+2) de 6 %. Une analyse de glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon après incubation des embryons en présence soit de glucose ou de glutamine pourrait permettre de définir l'origine des carbones constituant l'amidon.

### 3.1.3.6. Conclusion sur l'état isotopique stationnaire.

Dans ces expériences, les enrichissements moyens et enrichissements isotopiques des sucres libres (glucose, fructose, saccharose), des acides organiques libres

(citrate/isocitrate, fumarate, malate), des acides aminés libres (proline, valine, asparagine, lysine, arginine) et du glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon sont stables à 72 h excepté pour le malate (24h) et le glucose (24h). Les enrichissements isotopiques des deux carbones du fragment de Mc Lafferty du C16:0 et du C18:0 sont stables à 120h (**Figure 64**).



**Figure 64 : Evolution des enrichissements moyen en  $^{13}\text{C}$  des différents métabolites durant 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation.**

A : Evolution de l'enrichissement moyen de sucres libres pendant l'incubation ; B : Evolution de l'enrichissement moyen de matières organiques acides lors de l'incubation ; C : Evolution de l'enrichissement moyen des acides aminés libres au cours de l'incubation ; D : Evolution de l'enrichissement moyen des acides gras au cours de l'incubation.

Souvent les auteurs travaillant sur des embryons de plantes ne mentionnent pas vraiment la durée de culture pour laquelle l'état métabolique et l'état isotopique stationnaire sont atteints. En effet, dans ses travaux, Alonso *et al.* (2010) a juste indiqué que l'enrichissement isotopique des métabolites est stable à 7 jours sans fournir de données réelles. Lonien et Schwender (2009) ont évoqué les travaux de Troufflard *et al.* (2007) pour justifier de la durée de culture des embryons pour l'obtention des flux métaboliques. Les travaux de Troufflard *et al.* (2007) ont montré que l'état isotopique stationnaire des métabolites du métabolisme carboné des embryons de lin est atteint dès 18h d'incubation. Toutefois ces analyses ont été effectuées en RMN *in vivo* à l'obscurité et pouvant engendrer un état physiologique différent des embryons en culture dans des phytotrons. Ces données ne peuvent donc être comparées aux données obtenues dans cette thèse. Dans les

embryons de colza, les enrichissements isotopiques n'évoluent plus pour le saccharose, les acides aminés libres et l'amidon à partir de 3 jours d'incubation (Schwender *et al.*, 2003).

Bien que la culture d'embryons de lin en présence de deux substrats marqués (glutamine (U- $^{13}\text{C}_5$ ), glucose (U- $^{13}\text{C}_6$ )) et de deux substrats non marqués (glucose, glutamine) au cours du temps, ait permis de définir la date à laquelle l'état isotopique stationnaire est atteint, cette expérience n'a pas permis de discriminer la part de la glutamine et du glucose dans les enrichissements des différents métabolites. Cette détermination pourrait permettre d'apporter des éléments clés pour l'élaboration d'un modèle reflétant les réactions se déroulant dans les embryons de lin.

Dans nos expériences et pour la construction du réseau/carte métabolique et l'analyse des flux métaboliques, la culture des embryons s'effectuera avec un métabolite marqué durant 168 h, condition nécessaire pour que l'état métabolique et l'état isotopique stationnaire soient atteints dans nos conditions de culture.

## **3.2. Analyse préliminaire des flux métaboliques dans les embryons de lin.**

### **3.2.1. Construction du modèle.**

L'analyse des flux métaboliques au carbone 13 est définie comme étant une analyse de l'ensemble des flux métaboliques (flux internes et externes) au sein d'une cellule ou d'un organisme (Schwender, 2011). L'obtention de ces flux métaboliques est réalisée par un logiciel de calcul de flux à partir des données intégrées dans un fichier informatique (Fichier.ftbl). Ce fichier ftbl comporte le réseau métabolique à étudier qui se retrouve dans la section « NETWORK » du fichier.

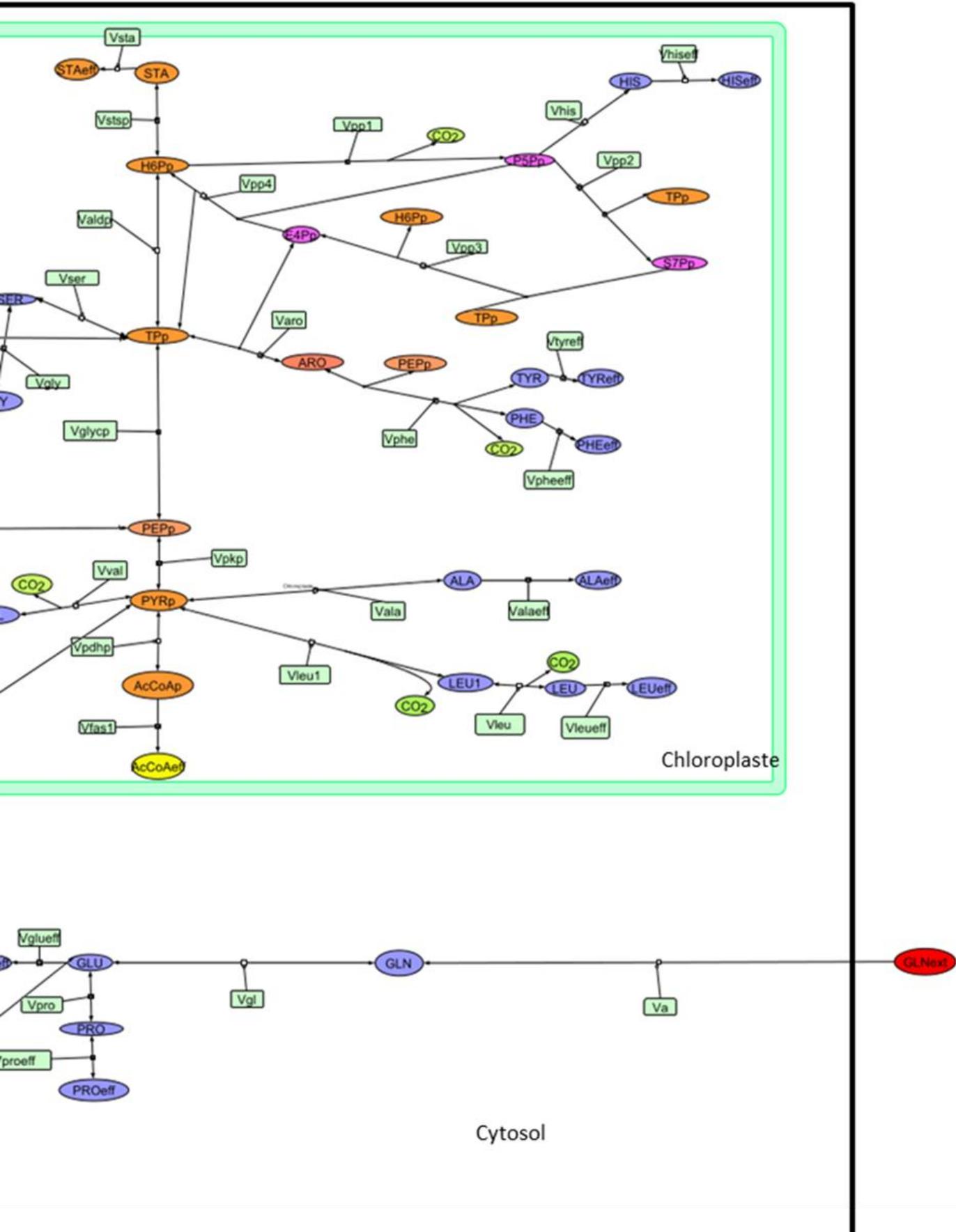
Le modèle élaboré pour l'analyse des flux métaboliques a été conçu à partir des données de l'analyse protéomique obtenues avec des embryons de lin au cours de la phase de maturation (Barvkar *et al.*, 2012 ; Klubicová *et al.*, 2013), des données d'analyses des flux métaboliques d'embryons photosynthétiques (Schwender *et al.*, 2003 ; Schwender *et al.*, 2004 ; Lonien et Schwender, 2009). Le modèle élaboré comprend 64 réactions faisant intervenir 62 métabolites dans 3 compartiments (cytosol, chloroplaste, mitochondrie) (**Figure 65**).

Les réactions rédigées dans la partie « NETWORK » du fichier ftbl comprennent les réactions de la glycolyse cytosolique, de la glycolyse plastidiale, de la voie des pentoses phosphates, des transporteurs cytosol/plastidiaux, des trioses phosphates et du phosphoénolpyruvate, les réactions du cycle de Krebs, les voies de biosynthèses des acides aminés, des sucres nécessaires à la formation des parois cellulaires, de l'acétyl-CoA plastidial nécessaire à la synthèse des acides gras et du glycérol-3-phosphate nécessaire à la formation des TAGs. Deux métabolites présents dans le milieu de culture sont considérés dans l'étude comme des « LABEL INPUT », le glucose (GLCext) et la glutamine (GLNnext) (**Figure 65**).

Dans la littérature, il a été montré que la combinaison de différentes expériences de marquage pour l'analyse des flux métaboliques dans les embryons permet une meilleure représentation du réseau métabolique (Schwender *et al.*, 2006; Alonso *et al.*, 2005, 2007; Libourel *et al.*, 2007; Allen *et al.*, 2009 ; Alonso *et al.*, 2010). Pour réaliser ce travail, deux incubations d'embryons de lin ont été effectuées. La première incubation a été réalisée dans un milieu de culture contenant 20 % de [1-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-glucose afin d'acquérir des connaissances complémentaires au niveau de la glycolyse et de la réversibilité de la glycolyse chez le lin. La seconde incubation a été effectuée dans un milieu de culture contenant 100 % de [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-glutamine afin d'obtenir des informations de marquage sur les acides organiques du cycle de Krebs. Les cultures d'embryons ont été réalisées dans les conditions décrites précédemment (Matériel et Méthode &2.4.2) et pendant 168 heures afin que l'état métabolique et l'état isotopique stationnaire soient atteints. Après incubation, les acides gras, sucres libres, acides organiques libres et amidon ont été extraits (Matériel et Méthode &2.4.5). Les enrichissements isotopiques des sucres libres, de l'amidon, des acides organiques et du fragment de Mc Lafferty de l'acide palmitique ont été déterminés (Matériel et Méthode &2.4.5) puis analysés. Trois répétitions biologiques ont été effectuées pour chaque incubation. Ces données permettent également de définir les sources de carbones permettant la synthèse des acides gras.



Milieu de culture / Albumen



**Figure 65 : Modèle utilisé pour l'analyse des flux métaboliques dans les embryons de lin, rédigé au format FTBL.**

**Métabolites :** GLNext : glutamine externe ; GLN : glutamine ; GLU : glutamate ; PRO : proline ; AKG : kétooglutarate ; SUCC : succinate ; FUM : fumarate ; MAL : malate ; OAA : oxaloacetate ; ICIT : isocitrate ; CIT : citrate ; AcCoA : acétyl-CoA ; PYRm : pyruvate mitochondriale ; ASP : aspartate ; THR : thréonine ; ILE : isoleucine ; LYS : lysine ; PYRc : pyruvate cytosolique ; PEP : phosphoenolpyruvate cytosolique ; TP : triose phosphate ; G3P : glyceraldéhyde-3-phosphate ; F6P : fructose-6-phosphate ; G6P : glucose-6-phosphate ; WALL : composés pariétaux ; GLC ext : glucose externe ; GLC : glucose ; STA : amidon ; H6Pp : hexose phosphate plastidial ; TPp : triose phosphate plastidiale ; PEPp : phosphoenolpyruvate plastidiale ; PYRp : pyruvate plastidial ; AcCoAp : acétyl-CoA plastidiale ; ARO : intermédiaires aromatiques ; TYR : tyrosine ; PHE : phénylalanine ; ALA : alanine ; LEU1 : intermédiaire de la voie de biosynthèse de la leucine ; LEU : leucine ; VAL : valine ; GLY : glycine ; SER : sérine ; HIS : histidine ; P5Pp : ribose-5-phosphate ; S7Pp : sedoheptulose 7-phosphate ; E4Pp : érythrose-4-phosphate plastidiale ; CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone ; Les métabolites comportant le suffixe eff sont les métabolites dosés. **Enzymes :** Vg : import de glucose ; Vhk1 : hexokinase ; Vgf : phosphoglucose isomérase ; Vald : aldolase ; Vglyco : phosphoglycérate ; Vpep : énoïase ; Vpk : pyruvate kinase ; Vpyr : transport de pyruvate ; Vpdh : pyruvate déshydrogénase ; Vcs : citrate synthase ; Vca : Aconitase ; Viso : Isocitrate déshydrogénase ; Vsfa : cétooglutarate déshydrogénase ; Vfum1/2 : succinate déshydrogénase ; Vfum : fumarase ; Vmdh : malate déshydrogénase ; Vme : pyruvate carboxylase ; Vasp : aspartate transaminase ; Vaspeff : asparagine synthétase ; Vthr : homosérine kinase ; Vthreff : thréonine synthase ; Vile : dihydroxyacide déshydratase ; Vileeff : acide aminé aminotransférase ; Vlys : dihydrodipicolinate synthase/réductase ; Vlyseff : diamino pimélate décarboxylase ; Vakg : glutamate déshydrogénase ; Vglueff : glutamate synthase ; Vgl : glutamate synthase ; Vpro : glutamyl kinase ; Vproeff : pyrroline-5-carboxylase réductase ; Va : entrée de glutamine ; Vfas2 (a/b) : glycérol 3-phosphate déshydrogénase ; Vtcp : transporteur de triose phosphate entre le cytosol au chloroplaste ; Vpep : transporteur de pep du cytosol vers le chloroplaste ; Vstsp/Vsta : enzyme branchante ; Valdp : aldolase plastidial ; Vglycp : phosphoglycérate plastidial ; Vpkp : pyruvate kinase plastidial ; Vpdhp : pyruvate déshydrogénase plastidial ; Vfas1 : acétyl-CoA carboxylase plastidial ; Vval /Vvaleff : synthèse valine ; Vala/alaeff : alanine-cétoisovalérate aminotransférase ; Vleu1 : isopropylmalate synthase/isomérase/déshydrogénase ; Vleu : isopropylmalate déshydrogénase ; Vleueff : amino acide aminotransférase ; Vser : phosphosérine aminotransférase ; Vserreff : phosphosérine phosphatase ; Vgly/Vglyeff : glycine hydroxyméthyltransférase ; Varo : chorismate synthase ; Vphe : chorismate mutase ; Vpheeff : préphénate déshydratase ; Vtyreff : préphénate déshydrogénase ; Vpp1 : gluconate déshydrogénase ; Vpp2 : transcétolase ; Vpp3 : transaldolase ; Vpp4 : DHAP synthase ; Vhis : ribose phosphate pyrophosphokinase ; Vhiseff : histidinal déshydrogénase ; Vmal : enzyme malique.

### 3.2.1.1. Analyse des enrichissements isotopiques dans un milieu de culture contenant 20 % de [1-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]- glucose.

#### 3.2.1.1.1. Analyse des sucres libres et de l'amidon.

Les enrichissements isotopiques des sucres libres et de l'amidon dans les embryons de lin incubés dans un milieu de culture contenant 20 % de [1-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-glucose sont présentés dans le **Tableau XXX** et le **Tableau XXXI**.

L'enrichissement en carbone 13 des sucres libres, après incubation dans un milieu de culture contenant 20 % de [1-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>]-glucose, a été de 17±1 % sur un carbone (m+1) du glucose extrait des embryons de lin. Cet enrichissement a été moins important que celui observé sur le glucose se trouvant dans le milieu de culture (m+1 : 20 ± 0 %) (**Tableau XXX**). Dans ce cas, il semblerait que l'enrichissement légèrement dilué du glucose contenu dans les embryons de lin analysés proviendrait du glucose-6-phosphate, soit par l'action potentielle d'une glucose-6-phosphatase soit par la sucrose synthase ou par la dégradation de l'amidon. Des résultats similaires ont été reportés dans les embryons de maïs (Alonso *et al.*, 2010) et dans les cellules de la pointe racinaire de maïs (Alonso *et al.*, 2005). Toutefois, les analyses protéomiques effectuées dans les embryons des graines de lin n'ont pas permis de démontrer la présence d'une glucose-6-phosphatase (Barvkar *et al.*, 2012 ; Klubicová *et al.*, 2013). Sa présence et son activité restent donc à démontrer.

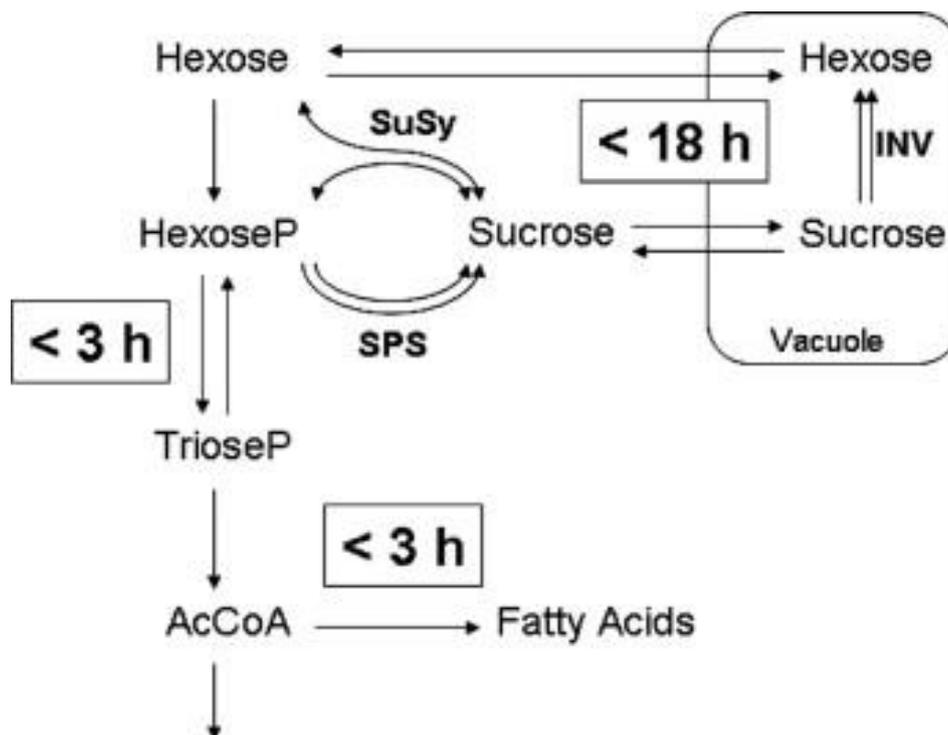
Dans ces mêmes conditions d'incubation, le fructose présente un enrichissement isotopique similaire à celui enregistré pour le carbone 13 du glucose (m+1 : 17±1 %) (**Tableau XXX**). Le fructose pourrait être formé soit à partir du glucose ou former du glucose à partir du fructose-6-phosphate via la phosphoglucose isomérase, une potentielle glucose-6-phosphorylase ou via la sucrose synthase. Le saccharose est enrichi à 31±1 % de 2 carbones marqués (m+2) correspondant à l'enrichissement du glucose et de fructose réunis. Le saccharose est synthétisé par la saccharose phosphate synthase à partir du glucose-6-P et du fructose 6-P.

**Tableau XXX : Enrichissements isotopiques des sucres libres après culture d'embryons de lin (*Astral*) âgés de 16 JAF en présence de 20 % de [1-13C<sub>1</sub>]-glucose.**

Metabolites	Carbone	isotopomères de masse	20 % de [1-13C <sub>1</sub> ] glucose	
			Moyenne	Ecart type
<b>Glucose ext</b>	1,2,3,4,5,6	m0	0,80	0,00
		m+1	0,20	0,00
		m+2	0,00	0,00
		m+3	0,00	0,00
		m+4	0,00	0,00
		m+5	0,00	0,00
		m+6	0,00	0,00
<b>Glucose</b>	1,2,3,4,5,6	m0	0,83	0,01
		m+1	0,17	0,01
		m+2	0,00	0,00
		m+3	0,00	0,00
		m+4	0,00	0,00
		m+5	0,00	0,00
		m+6	0,00	0,00
<b>Fructose</b>	1,2,3,4,5,6	m0	0,83	0,01
		m+1	0,17	0,01
		m+2	0,00	0,00
		m+3	0,00	0,00
		m+4	0,00	0,00
		m+5	0,00	0,00
		m+6	0,00	0,00
<b>Saccharose</b>	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12	m0	0,68	0,01
		m+1	0,32	0,01
		m+2	0,00	0,00
		m+3	0,00	0,00
		m+4	0,00	0,00
		m+5	0,00	0,00
		m+6	0,00	0,00
		m+7	0,00	0,00
		m+8	0,00	0,00
		m+9	0,00	0,00
		m+10	0,00	0,00
		m+11	0,00	0,00
		m+12	0,00	0,00

Trois cultures d'embryons (répétitions biologiques) dans un milieu de culture contenant 20 % de [1-13C<sub>1</sub>]-glucose ont été effectuées pour déterminer les moyennes et les écarts-types.

La distribution isotopique du saccharose est particulièrement intéressante du fait de son origine biosynthétique, les fractions glucosyle et fructosyle reflètent l'état de marquage des pools de glucose 6-phosphate et de fructose 6-phosphate cytosoliques, respectivement. L'analyse des enrichissements isotopiques du saccharose par RMN d'embryons de lin dans un milieu de culture  $[1-^{13}\text{C}_1]$ -glucose a montré un enrichissement du C1 et C6 de la fraction glycosyle et fructosyle. Ces travaux ont montré que le marquage en C1 est dû à la conversion directe de  $[1-^{13}\text{C}]$  glucose en hexose phosphates puis en saccharose (Figure 66).



**Figure 66 : Représentation schématique des échanges entre les hexoses, hexoses phosphates, saccharose et triose phosphate dans le métabolisme de l'embryon de lin au cours des expériences  $^{13}\text{C}$ -étiquetage (Troufflard *et al.*, 2007).**

L'état isotopique stationnaire dans la voie de la glycolyse et de la synthèse de l'acétyl-CoA était atteint dès 3 h d'incubation, alors que l'état isotopique stationnaire est atteint à 18h pour le saccharose.

Le marquage au C6 est généralement observé dans les plantes et vient de la réversibilité des réactions dans la partie supérieure de la glycolyse (Hatzfeld et Stitt, 1990; Fernie *et al.*, 2001) et de la transaldolase (Dieuaide-Noubani *et al.*, 1995). Les positions C2, C4 et C5 ont une faible probabilité d'être marqué en carbone 13 à partir de  $[1-^{13}\text{C}_1]$  glucose (Roscher *et al.*, 2000). Ces réactions sont donc à prendre en compte pour l'établissement du modèle lin.

**Tableau XXXI : Enrichissements isotopiques du glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon après culture d'embryons de lin (*Astral*) âgés de 16 JAF en présence de 20 % de [1-13C<sub>1</sub>]-glucose.**

3 cultures d'embryons (répétitions biologiques) dans un milieu de culture contenant 20 % de [1-13C<sub>1</sub>]-glucose ont été effectuées pour déterminer les moyennes et les écarts -types.

Metabolites	Carbone	isotopomères de masse	20 % de [1-13C <sub>1</sub> ] glucose	
			Moyenne	Ecart type
Amidon (glucose)	1,2,3,4,5,6	m0	0,89	0,06
		m+1	0,11	0,06
		m+2	0,00	0,00
		m+3	0,00	0,00
		m+4	0,00	0,00
		m+5	0,00	0,00
		m+6	0,00	0,00

Dans les embryons des graines de lin, l'amidon est accumulé de manière transitoire dans les chloroplastes avant le début de l'accumulation des huiles, mais est toujours présent durant la phase de synthèse des acides gras (Troufflard, 2004 ; Troufflard *et al.*, 2007) (**Figure 52**). Dans la littérature, il a été montré que l'amidon est continuellement en turnover et est synthétisé à partir du glucose-6-phosphate plastidial. Par conséquent, le marquage de l'amidon représente le marquage des hexoses phosphates plastidiaux pendant la synthèse des huiles. Son analyse permet l'accès aux flux métaboliques plastidiaux. L'analyse des enrichissements isotopiques du glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon après culture des embryons de lin en présence de 20 % de [1-13C<sub>1</sub>] glucose, a montré un enrichissement d'un carbone (m+1) du glucose de  $11 \pm 6$  %. Cet enrichissement est plus faible que celui observé pour le glucose ou le fructose (**Tableau XXXI** ;  $17,0 \pm 0,1\%$ ).

Ce faible enrichissement du glucose provenant de l'amidon pourrait venir en partie du glucose-6-phosphate importé du cytosol au niveau du plaste, mais également du glucose-6-phosphate chloroplastique synthétisé par la phosphoglucose isomérase à partir du fructose-6-phosphate chloroplastique lui-même produit à partir des pentoses phosphates.

#### 3.2.1.1.2. Analyse des acides organiques et du fragment de Mc Lafferty de l'acide palmitique.

Les enrichissements isotopiques au carbone 13 des acides organiques provenant des embryons incubés en présence de 20 % de [1-13C<sub>1</sub>]-glucose (**Tableau XXXII**), ont montré un

enrichissement de  $14\pm 1\%$  au niveau d'un carbone marqué (m+1) pour la citrate/isocitrate, de  $9\pm 1\%$  pour le succinate (m+1), de  $8\pm 1\%$  pour le fumarate (m+1), et de  $8\pm 1\%$  pour le malate (m+1).

**Tableau XXXII : Enrichissements isotopiques des acides organiques et du fragment de Mc Lafferty de l'acide palmitique après culture d'embryons de lin (*Astral*) âgés de 16 JAF avec 20 % de [1- $^{13}\text{C}_1$ ]-glucose.**

Trois cultures d'embryons (répétitions biologiques) dans un milieu de culture contenant 20 % de [1- $^{13}\text{C}_1$ ]-glucose ont été effectuées pour déterminer les moyennes et les écarts types.

Metabolites	Carbone	isotopomères de masse	20 % [1- $^{13}\text{C}_1$ ] glucose	
			Moyenne	Ecart type
Fragment de Mc Lafferty C16:0	1,2	m 0	0,94	0,01
		m+1	0,06	0,01
		m+2	0,00	0,00
Succinate	1,2,3,4	m0	0,91	0,01
		m+1	0,09	0,01
		m+2	0,00	0,00
		m+3	0,00	0,00
		m+4	0,00	0,00
Malate	1,2,3,4	m0	0,92	0,01
		m+1	0,08	0,01
		m+2	0,00	0,00
		m+3	0,00	0,00
		m+4	0,00	0,00
Fumarate	1,2,3,4	m0	0,92	0,01
		m+1	0,08	0,01
		m+2	0,00	0,00
		m+3	0,00	0,00
		m+4	0,00	0,00
Citrate/isocitrate	1,2,3,4,5,6	m0	0,86	0,00
		m+1	0,14	0,00
		m+2	0,00	0,00
		m+3	0,00	0,00
		m+4	0,00	0,00
		m+5	0,00	0,00
		m+6	0,00	0,00

L'enrichissement du citrate/isocitrate d'un carbone est moins important que celui du fructose ( $m+1 : 17\pm 1 \%$ ) et pourrait être dû à la contribution de la glutamine non marquée présente dans le milieu de culture mais également à des étapes de décarboxylation au niveau de la glycolyse. En effet, le complexe pyruvate déshydrogénase permet la synthèse d'acétyl-CoA cytosolique (précurseur de la synthèse de la citrate/isocitrate) à partir de la pyruvate mitochondriale et libère une molécule de dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) (Buchanan *et al.*, 2000).

Ainsi, l'action du complexe pyruvate déshydrogénase pourrait produire une molécule d'acétyl-CoA cytosolique présentant un marquage moins important que le marquage en carbone 13 des sucres libres. Le marquage en carbone 13 du succinate est moins important ( $m+1 : 9\pm 1 \%$ ) que celui observé pour le citrate/isocitrate ( $m+1 : 14\pm 1 \%$ ). Ceci pourrait être dû à la perte de deux molécules de dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) par l'action de l'isocitrate déshydrogénase et de l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase permettant respectivement la conversion de l'isocitrate en cétoglutarate et du cétoglutarate en succinyl-CoA (Buchanan *et al.*, 2000). La présence de ces protéines a notamment été observée récemment dans les embryons de lin récemment (Klubíková *et al.*, 2013). La diminution du marquage d'un carbone du succinate peut également être due au fait que le précurseur de la synthèse du succinate s'effectue à partir du cétoglutarate. En effet, cette molécule peut être formée à partir de la glutamine non marquée présente dans le milieu de culture.

Pour déterminer l'apport du marquage de la glutamine sur le succinate, une analyse des enrichissements isotopiques des acides organiques après culture des embryons de lin dans un milieu de culture contenant de la glutamine marquée a été développée et sera présentée au paragraphe 2.1.2. Les enrichissements en carbone 13 du fumarate ( $m+1 : 8\pm 1 \%$ ) et du malate ( $m+1 : 8\pm 1 \%$ ) sont similaires à ceux du succinate, indiquant que la synthèse du fumarate à partir du succinate, du malate et du fumarate ne nécessite pas de décarboxylation. Dans la littérature, il est clairement mentionné que les deux enzymes responsables de la conversion du succinate en fumarate (la succinate déshydrogénase) et de la conversion du fumarate en malate (fumarase) ne nécessitent pas de décarboxylation (Buchanan *et al.*, 2000). L'analyse de l'enrichissement isotopique de l'acétyl-CoA plastidial provenant de l'acide palmitique montre un enrichissement d'un carbone 13 ( $m+1 : 6\pm 1 \%$ ) similaire à celui enregistré pour le malate ( $m+1 : 8\pm 1 \%$ ). Le malate pourrait être un

précurseur permettant la synthèse de l'acétyl-CoA plastidial. Dans les embryons de plantes hétérotrophes, l'enzyme malique permettant la synthèse de pyruvate plastidial (précurseur de l'acétyl-CoA plastidial) à partir du malate est mentionnée comme une voie très importante pour l'apport de carbone et de NADPH nécessaire à la synthèse des acides gras (Alonso *et al.*, 2010). Les analyses protéomiques effectuées sur les embryons de lin au cours de la phase d'accumulation des réserves a également montré la présence de cette enzyme (Bravkar *et al.*, 2012 ; Klubicová *et al.*, 2013). Une étude de l'enrichissement isotopique de l'acétyl-CoA plastidial provenant de l'acide palmitique d'embryons cultivés dans un milieu de culture contenant 100 % de [U- $^{13}\text{C}_5$ ]-glutamine pourrait permettre de définir la contribution de l'enzyme malique dans la synthèse des acides gras à partir de malate.

3.2.1.2. Analyse des enrichissements isotopiques dans un milieu de culture contenant 100 % de [U- $^{13}\text{C}_5$ ]-glutamine.

3.2.1.2.1. Analyse des acides organiques et du fragment de Mc Lafferty de l'acide palmitique.

Pour déterminer l'éventuelle contribution de la glutamine au marquage des acides organiques et des acides gras, des incubations d'embryons de lin *Astral* ont été effectuées dans un milieu de culture contenant 100 % de [U- $^{13}\text{C}_5$ ]-glutamine et de glucose non marqué dans les conditions décrites (Matériels et Méthodes 2.4.5). Les résultats sont présentés dans le **tableau XXXIII**.

Les incubations réalisées avec 100 % de [U- $^{13}\text{C}_5$ ]-glutamine et de glucose non marqué indiquent un enrichissement de plusieurs carbones (m+1; m+2; m+3; m+4) pour les molécules de succinate, de malate, de fumarate, prouvant la contribution de la glutamine marquée dans la synthèse de ces acides organiques. Cependant pour chaque composé, l'incorporation de carbone marqué ne s'est pas faite sur tous les carbones indiquant que la glutamine marquée n'a pas été utilisée uniquement dans ces réactions et/ou que du glucose non marqué a contribué à la synthèse de ces composés organiques. La synthèse du succinate à partir du cétooglutarate (provenant de la glutamine), nécessite une décarboxylation qui pourrait diminuer l'enrichissement du succinate et des autres acides organiques par rapport à l'enrichissement initial de la glutamine présente dans le milieu de culture. L'enrichissement isotopique de l'ensemble des carbones du succinate (m+4 : 35±1 %) est plus élevé que les enrichissements isotopiques observés pour les carbones du fumarate (m+4 : 17±1 %) et du

malate (m+4 : 16±2 %) indiquant une contribution 2 fois plus élevée du glucose marqué pour la synthèse de ces acides organiques. L'analyse de l'enrichissement isotopique du citrate/isocitrate indique un marquage d'un carbone (m+1 : 14±1 %), de deux carbones (m+2 : 9±1 %), de trois carbones (m+3 : 9±1%), de quatre carbones (m+4 : 9±1%) et de cinq carbones (m+5 : 15±2 %), mais pas de l'ensemble des carbones de la molécule (m+6 : 0,02±0,02 %).

**Tableau XXXIII : Enrichissements isotopiques des acides organiques et du fragment de Mc Lafferty de l'acide palmitique après culture d'embryons de lin (*Astral*) âgés de 16 JAF avec 100 % [U-13C<sub>5</sub>]-glutamine.**

Trois cultures d'embryons (répétitions biologiques) dans un milieu de culture contenant 100 % de [U-13C<sub>5</sub>]-glutamine ont été effectuées pour déterminer les moyennes et les écarts-types.

Metabolites	Carbone	isotopomères de masse	<i>Astral</i>	
			100 % [U-13C <sub>5</sub> ] glutamine	
			Moyenne	Ecart type
Fragment de Mc Lafferty C16:0	1,2	m 0	1,00	0,00
		m+1	0,00	0,00
		m+2	0,00	0,00
Succinate	1,2,3,4	m0	0,38	0,04
		m+1	0,11	0,05
		m+2	0,15	0,02
		m+3	0,06	0,06
		m+4	0,35	0,04
Malate	1,2,3,4	m0	0,51	0,02
		m+1	0,15	0,01
		m+2	0,10	0,01
		m+3	0,07	0,01
		m+4	0,17	0,01
Fumarate	1,2,3,4	m0	0,52	0,02
		m+1	0,15	0,01
		m+2	0,10	0,02
		m+3	0,07	0,01
		m+4	0,16	0,02
Citrate	1,2,3,4,5,6	m0	0,42	0,03
		m+1	0,14	0,01
		m+2	0,09	0,01
		m+3	0,09	0,01
		m+4	0,09	0,01
		m+5	0,15	0,02
		m+6	0,02	0,02

L'enrichissement en carbone 13 du citrate/isocitrate pourrait provenir de l'enrichissement en carbone 13 du malate et l'apport d'acétyl-CoA mitochondrial marqué permettant d'expliquer l'enrichissement de 5 carbones de cette molécule. La fixation du dioxyde de carbone marqué par la rubisco provenant de la décarboxylation du cétoglutarate (métabolite issu de la glutamine) par la cétoglutarate déshydrogénase pourrait permettre l'apport d'un carbone 13 marqué au niveau de l'acétyl-CoA mitochondrial expliquant pourquoi le citrate/isocitrate présente un enrichissement de ses 5 carbones ( $m+5$ :  $15 \pm 2$  %).

Alors que le malate est enrichi en carbone 13 lors d'une incubation en présence de 100 % de [U- $^{13}\text{C}_5$ ] glutamine et de glucose non marqué, aucun enrichissement isotopique du fragment de Mc Lafferty de l'acide palmitique n'a été observé. Ce résultat indique donc que l'enzyme malique qui permet la conversion du malate en pyruvate plastidial (précurseur de l'acétyl-CoA plastidial) ne semble pas contribuer à l'apport de carbone et de NADPH nécessaire à la synthèse des acides gras contrairement à ce qui a pu être noté pour des embryons hétérotrophes comme le maïs (Alonso *et al.*, 2010). Il semblerait donc que le substrat nécessaire à la synthèse des acides gras dans les embryons de lin soit le glucose.

#### 3.2.1.2.2. Analyse des sucres libres et de l'amidon.

Les incubations réalisées avec 100 % de [U- $^{13}\text{C}_5$ ]-glutamine a montré un enrichissement de  $8 \pm 2$  % d'un carbone marqué ( $m+1$ ) sur le glucose, de  $3 \pm 2$  % d'un carbone marqué ( $m+1$ ) sur le fructose et de  $6 \pm 2$  % d'un carbone marqué ( $m+1$ ) sur le saccharose. L'amidon n'est pas enrichi en carbone 13 (**Tableau XXXIV, Tableau XXXV**).

Ces résultats semblent indiquer que les carbones marqués au niveau de la glutamine peuvent se retrouver au niveau des sucres libres du cytosol. Cette observation semblerait impliquer une néoglucogenèse indiquant que les réactions de la glycolyse cytosolique sont réversibles. Toutes les enzymes de la glycolyse ne sont pas réversibles comme l'hexokinase assurant la formation de G6P à partir de glucose, la phosphofructokinase qui permet la synthèse de fructose 1,6 bisphosphate à partir de F6P et la pyruvate kinase qui permet la formation de la pyruvate à partir de PEP (**Figure 65**). Elles sont caractérisées par une variation d'énergie libre  $\Delta G$  fortement négative. Lors de la néoglucogenèse, ces étapes sont catalysées par des enzymes différentes qui rendent la formation du glucose thermodynamiquement favorable (**Figure 65**).

**Tableau XXXIV : Enrichissements isotopiques des sucres libres après culture d'embryons de lin (*Astral*) âgés de 16 JAF en présence de 20 % de [U-13C<sub>5</sub>]-glutamine.**

Trois cultures d'embryons (répétitions biologiques) dans un milieu de culture contenant 100 % de [U-13C<sub>5</sub>]-glutamine ont été effectuées pour déterminer les moyennes et les écarts-types.

Metabolites	Carbone	isotopomères de masse	<i>Astral</i> 100 % [U-13C <sub>5</sub> ] glutamine	
			Moyenne	Ecart type
<b>Glucose ext</b>	1,2,3,4,5,6	m0	1	0
		m+1	0,00	0,00
		m+2	0,00	0,00
		m+3	0,00	0,00
		m+4	0,00	0,00
		m+5	0,00	0,00
		m+6	0,00	0,00
<b>Glucose</b>	1,2,3,4,5,6	m0	0,92	0,02
		m+1	0,08	0,02
		m+2	0,02	0,01
		m+3	0,00	0,00
		m+4	0,00	0,00
		m+5	0,00	0,00
		m+6	0,00	0,00
<b>Fructose</b>	1,2,3,4,5,6	m0	0,94	0,02
		m+1	0,03	0,02
		m+2	0,01	0,01
		m+3	0,01	0,01
		m+4	0,00	0,00
		m+5	0,00	0,00
		m+6	0,00	0,00
<b>Saccharose</b>	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12	m0	0,93	0,02
		m+1	0,06	0,02
		m+2	0,01	0,01
		m+3	0,00	0,00
		m+4	0,00	0,00
		m+5	0,00	0,00
		m+6	0,00	0,00
		m+7	0,00	0,00
		m+8	0,00	0,00
		m+9	0,00	0,00
		m+10	0,00	0,00
		m+11	0,00	0,00
		m+12	0,00	0,00

La synthèse du PEP à partir du pyruvate pourrait se faire par la pyruvate carboxylase qui permet la formation de l'oxaloacétate à partir de pyruvate et de la phosphoénolpyruvate carboxykinase. Cette synthèse de PEP pourrait également être effectuée par la PPK (pyruvate phosphate dikinase) qui catalyse la conversion du pyruvate en ATP et Pi en PEP, AMP, P<sub>pi</sub>. La néoglucogenèse pourrait également mettre en évidence la présence de la fructose 1,6 bisphosphatase assurant la formation de la fructose 1,6 bisphosphate en fructose-6-phosphate et la glucose 6 phosphatase qui, elle, permet la formation de glucose à partir du glucose-6-phosphate dans les embryons de lin au cours de la synthèse des acides gras. La présence de ces différentes enzymes pourrait permettre le marquage en carbone 13 du fructose, du glucose et du saccharose à partir de la glutamine marquée.

**Tableau XXXV : Enrichissements isotopiques du glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon après culture d'embryons de lin (*Astral*) âgés de 16 JAF en présence de 100 % de [U-13C<sub>5</sub>]-glutamine.**

Trois cultures d'embryons (répétitions biologiques) dans un milieu de culture contenant 100 % de [U-13C<sub>5</sub>]-glutamine ont été effectuées pour déterminer les moyennes et les écarts-types.

Metabolites	Carbone	isotopomères de masse	<i>Astral</i> 100 % [U-13C <sub>5</sub> ] glutamine	
			Moyenne	Ecart type
<b>Amidon (glucose)</b>	1,2,3,4,5,6	m0	1,00	0,00
		m+1	0,00	0,00
		m+2	0,00	0,00
		m+3	0,00	0,00
		m+4	0,00	0,00
		m+5	0,00	0,00
		m+6	0,00	0,00

La présence d'une PPK a déjà été observée chez les plante de type C3 et notamment dans l'albumen des graines de riz (Kang *et al.*, 2005). L'étude de la PPK dans l'albumen de riz suggère que cette enzyme pourrait soit moduler le métabolisme carboné pendant le remplissage de la graine en augmentant la quantité de P<sub>pi</sub> dans le cytosol, soit réguler la quantité d'AMP/ATP nécessaire à la synthèse des huiles. Ceci pourrait être une réponse à l'hypoxie existante dans les embryons due à la faible teneur en O<sub>2</sub> et/ou au ratio ATP/AMP diminuant durant le remplissage des lipides. Les auteurs suggèrent que la PPK pourrait être impliquée dans le métabolisme des composés de réserve durant l'embryogenèse en assurant la conversion de l'AMP en ATP dans les graines en développement permettant ainsi une augmentation du pool d'ATP pouvant être nécessaire à

la synthèse des acides gras. Les analyses protéomiques effectuées dans les embryons de lin n'ont pas permis de déterminer la présence de cette enzyme (Barvkar *et al.*, 2012 ; Klubicová *et al.*, 2013).

Les analyses protéomiques dans les embryons n'ont également pas mis en évidence la présence de la pyruvate carboxylase, de la phosphoénolpyruvate carboxykinase, de la fructose 1,6 bisphosphate et de la glucose 6 phosphatase (Barvkar *et al.*, 2012 ; Klubicová *et al.*, 2013). Toutefois les réactions de la néoglucogenèse pourraient également expliquer pourquoi l'enrichissement en carbone 13 du glucose, après incubation des embryons dans un milieu de culture contenant 20 % de [1- $^{13}\text{C}_1$ ]-glucose, ait été plus faible ( $17\pm 1$  % sur un carbone (m+1)) que celui du glucose présent dans le milieu de culture (m+1 :  $20\pm 0$  %). Leurs présences restent donc à valider.

#### 3.2.1.3. Modèle élaboré.

La réaction de l'enzyme malique a été contrainte à 0. La voie de biosynthèse de l'amidon et les réactions du cycle de Krebs ont également été considérées comme étant réversibles. Plusieurs simplifications mathématiques ont été utilisées pour le calcul des flux métaboliques. Ces simplifications sont nécessaires pour ne pas avoir des matrices de grandes dimensions pouvant limiter les calculs de flux. La voie de biosynthèse du saccharose n'a pas été prise en compte dans le modèle puisque l'intégration de l'enrichissement pour l'ensemble des carbones génère des matrices de dimensions trop importantes et difficilement gérables au niveau calcul.

#### 3.2.2. Analyse des flux métaboliques dans les embryons de lin *Astral*.

Afin d'effectuer l'analyse des flux métaboliques dans les embryons de lin *Astral*, des embryons ont été récoltés à 16 JAF (début de la synthèse des composés de réserve) puis incubés dans un milieu de culture (Matériel et Méthodes : & 2.4.6.2.6) contenant 60 % de [U- $^{13}\text{C}_6$ ]-glucose et 40 % de [2- $^{13}\text{C}_{1,2}$ ]-glucose et 100 % de glutamine non marqué. Les incubations ont été effectuées durant 168 heures afin d'être à l'état stationnaire métabolique et isotopique (chapitre 3 - Partie 1). Une partie des embryons incubés ont été récoltés, lavés. Après extraction des métabolites, la détermination des enrichissements isotopiques a été faite sur l'unité d'acétyl-CoA de l'acide palmitique, sur les sucres libres (glucose, fructose), l'amidon et les acides organiques (succinate, fumarate, citrate, malate).

Ces données (**Annexe 9**) serviront à alimenter la partie « MASS SPECTROMETRY » du fichier ftbl.

#### 3.2.2.1. Détermination des flux extracellulaires.

Les embryons incubés ont été récoltés et ont servi à l'extraction des huiles, des protéines et de l'amidon en utilisant le protocole d'extraction séquentielle quantitatif (Matériels et Méthodes, & 2.4.6.2.4). Les vitesses de synthèse des différents composés de réserve ont ainsi pu être calculées. Le milieu de culture a également été récupéré et analysé pour déterminer les vitesses de consommation du glucose et de la glutamine. Ces données seront utilisées pour alimenter la partie « FLUX\_MEASUREMENTS » du fichier ftbl (**Annexe 9**).

La quantification du glucose et de la glutamine dans le milieu de culture a permis de calculer la vitesse de consommation de ce glucose ( $330 \pm 10$  nmol de glucose. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$  - Vg) et de cette glutamine ( $21 \pm 6$  nmol de glutamine. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$  - Va). La quantification des huiles, de l'amidon, et des acides aminés (glutamate, sérine, glycine, thréonine, phénylalanine, proline, histidine) dans les embryons de lin *Astral* incubés dans le milieu de culture pendant 168 heures, a montré que la vitesse de synthèse des huiles (Vfas1 :  $54 \pm 3$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ) est la plus importante par rapport aux vitesses de synthèse des autres composés. En effet, les vitesses de synthèse de l'amidon (Vsta :  $1,6 \pm 0,7$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ), du glutamate (Vglueff :  $0,1 \pm 0,2$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ), de la sérine (Vsereff :  $3,9 \pm 0,1$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ), de la glycine (Vglyeff :  $7,2 \pm 0,2$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ), de la thréonine (Vthreff :  $0,44 \pm 0,04$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ), de la phénylalanine (Vpheeff :  $1,2 \pm 0,2$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ), de la proline (Vproeff :  $1,40 \pm 0,04$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ) et de l'histidine (Vhiseff :  $4,88 \pm 0,01$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ) sont inférieures à la vitesse de synthèse des acides gras (**Tableau XXXVI**).

Les vitesses de synthèse de ces différents composés ont été intégrées dans le fichier ftbl dans la section « FLUX MEASUREMENTS ».

**Tableau XXXVI : Flux extracellulaires mesurés (nmol.h.<sup>-1</sup>embryon<sup>-1</sup>).**

Réactions	<i>Astral</i>	
	Moyenne	Ecart type
<b>Vg</b>	330	10
<b>Va</b>	21	6
<b>Vsta</b>	1,6	0,7
<b>Vfas1</b>	54	3
<b>Vglueff</b>	0,1	0,2
<b>Vsereff</b>	3,9	0,1
<b>Vglyeff</b>	7,2	0,2
<b>Vthreff</b>	0,44	0,04
<b>Vpheeff</b>	1,2	0,2
<b>Vproeff</b>	1,40	0,04
<b>Vhiseff</b>	4,88	0,01

V sta : vitesse de synthèse de l'amidon ; Vfas1 : vitesse réactionnelle de la acétyl-CoA carboxylase Vglueff : vitesse réactionnelle de la glutamate synthase ; Vsereff : vitesse réactionnelle de la phosphosérine phosphatase ; Vglyeff : vitesse réactionnelle de la glycine hydroxyméthyltransférase ; Vpheeff : vitesse réactionnelle de la préphenate déshydratase ; V hiseff : vitesse réactionnelle de la histidinal déshydrogénase.

#### 3.2.2.2. Choix des contraintes pour le modèle.

Afin d'obtenir les flux métaboliques dans les embryons de la lignée *Astral*, des contraintes ont dû être fixées. Ces contraintes ont été choisies à partir des données obtenues dans la littérature (Morris, 2007) et des données d'enrichissements obtenues pour le lin (**Résultats et Discussions- Chapitre 3, & 2.2.1**). Ces contraintes ont été intégrées dans la partie « INEQUALITIES » du fichier ftbl. Ces contraintes correspondent notamment aux flux extracellulaires de synthèse des acides aminés qui n'ont pu être quantifiés. Pour pallier ce manque il a été décidé d'indiquer au réseau des vitesses de synthèse pour l'asparagine (Vaspeff), la lysine (Vlyseff), l'isoleucine (Vileeff), la leucine (Vleueff), l'alanine (Valaeff), la valine (Vvaleff), la tyrosine (Vtyreff) comprises entre [0,1 à 10] nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>. Les vitesses de synthèse de la voie des pentoses phosphates (Vpp1 ; Vpp2 ; Vpp3 ; Vpp4), de la glycolyse (Vhk1 ; Vme ; Vpdh ; Vpk) et de la voie de biosynthèse des acides gras (Vfas1) ont été considérées comme supérieures ou égales à 0. Les vitesses de synthèse du glycérol-3-phosphate (Vfas2) ont été considérées comme supérieures ou égales à 1. Les réactions d'entrée de glutamine (Va) et de glucose (Vg) et celle de la synthèse de l'amidon (Vsta) ont été bornées par les écarts types de leurs flux extracellulaires. L'analyse des isotopomères de masse du fragment de Mc Lafferty provenant de l'acide palmitique, après incubation des embryons de lin en présence de glutamine uniformément marqué au carbone 13, n'a pas

montré d'enrichissements d'isotopiques (&2.1.2.1). Par contre, les acides organiques présentent des enrichissements isotopiques (&2.1.2.1). Ces résultats semblent indiquer que la glutamine n'est pas un substrat pour la synthèse des acides gras et que l'enzyme malique ne semble pas non plus contribuer à leur synthèse. C'est pourquoi il a été décidé d'appliquer la contrainte nulle pour le flux provenant de l'enzyme malique (V<sub>mep</sub>). Pour que le modèle réponde aux contraintes intégrées dans la partie « FLUX MEASUREMENTS » et « MASS SPECTROMETRY », il a également été décidé d'attribuer un flux pour la réaction de synthèse des parois végétales/mucilage (V<sub>wall</sub>). Ce flux a été évalué comme étant supérieur ou égal à 230 nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup> (**Annexe 9**).

### 3.2.2.3. Calcul des flux métaboliques.

Le fichier ftbl a été converti en un fichier fml pouvant être lu par le logiciel de calcul de flux SYSTMETAB. Le logiciel SYSTMETAB permet d'avoir accès aux flux intracellulaires en effectuant une simulation du réseau avec les données expérimentales et en comparant les enrichissements isotopiques des données à ceux simulés. Les vitesses de flux intracellulaires sont calculées par la méthode de Monte-Carlo (**Annexe 10**). Afin de simplifier l'analyse, seuls, les valeurs de flux net ont été placées sur la carte de flux métabolique en utilisant le logiciel CellDesigner 4.4 (**Figure 67**).

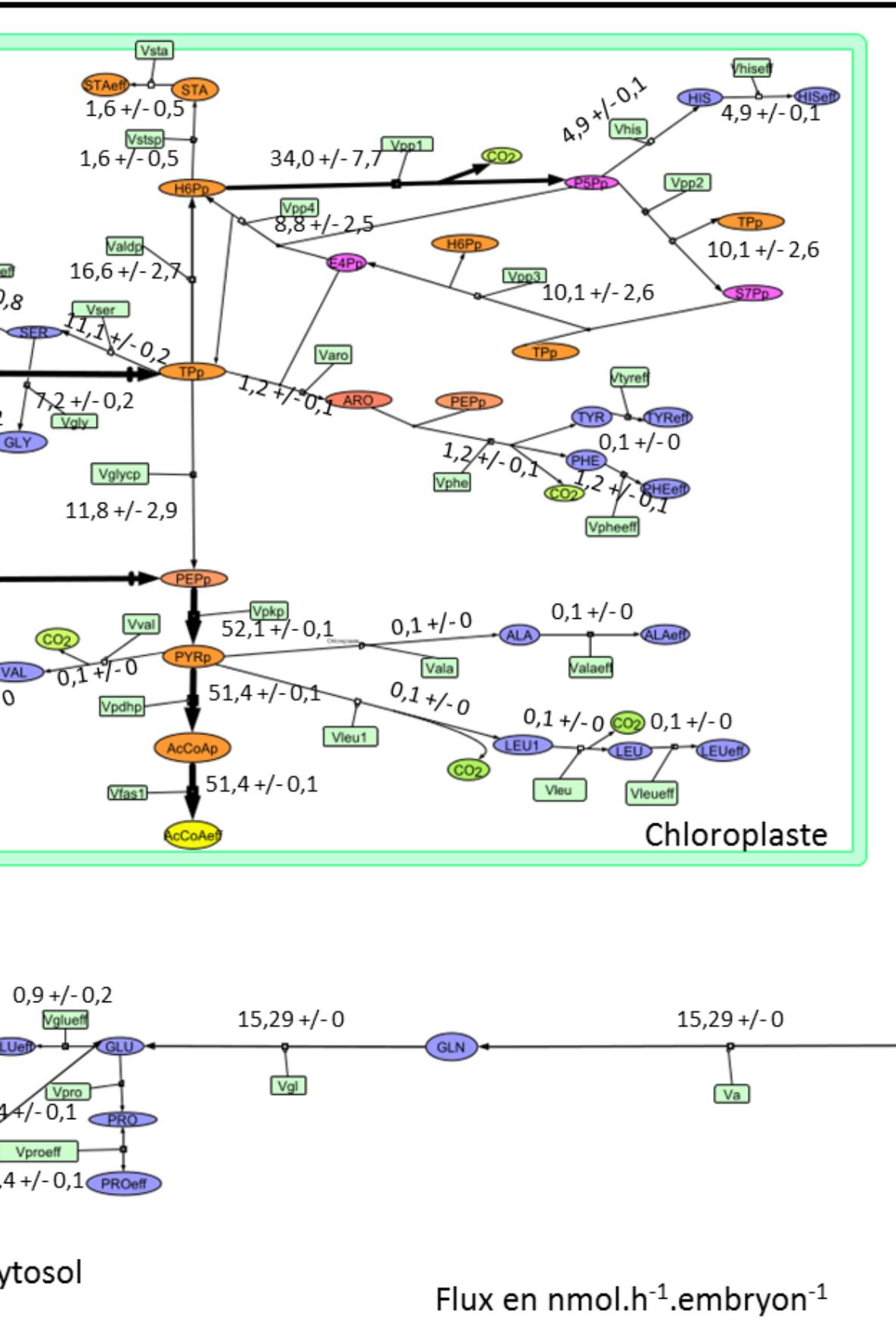
#### **Figure 67 : Flux métaboliques (nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>) dans les embryons de la lignée *Astral*.**

**Métabolites** : GLN<sub>ext</sub> : glutamine externe ; GLN : glutamine ; GLU : glutamate ; PRO : Proline ; AKG : cétoglutarate ; SUCC : succinate ; FUM : fumarate ; MAL : malate ; OAA : oxaloacetate ; ICIT : isocitrate ; CIT : citrate ; AcCoA : acétyl-CoA ; PYR<sub>m</sub> : pyruvate mitochondriale ; ASP : aspartate ; THR : thréonine ; ILE : isoleucine ; LYS : lysine ; PYR<sub>c</sub> : pyruvate cytosolique ; PEP : phosphoénolpyruvate cytosolique ; TP : triose phosphate ; G3P : glyceraldéhyde-3-phosphate ; F6P : fructose-6-phosphate ; G6P : glucose-6-phosphate ; WALL : composés pariétaux ; GLC<sub>ext</sub> : glucose externe ; GLC : Glucose ; STA : amidon ; H6P<sub>p</sub> : hexose phosphate plastidial ; TP<sub>p</sub> : triose phosphate plastidiale ; PEP<sub>p</sub> : phosphoénolpyruvate plastidiale ; PYR<sub>p</sub> : pyruvate plastidial ; AcCoA<sub>p</sub> : acétyl-CoA plastidiale ; ARO : intermédiaires aromatiques ; TYR : tyrosine ; PHE : phénylalanine ; ALA : alanine ; LEU1 : intermédiaire de la voie de biosynthèse de la leucine ; LEU : leucine ; VAL : valine ; GLY : glycine ; SER : sérine ; HIS : histidine ; P5P<sub>p</sub> : ribose-5-phosphate ; S7P<sub>p</sub> : sédoheptulose 7-phosphate ; E4P<sub>p</sub> : érythrose-4-phosphate plastidiale ; CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone ; Les métabolites comportant le suffixe eff sont les métabolites dosés. **Enzymes** : Vg : import de glucose ; Vhk1 : hexokinase ; Vgf : Phosphoglucose isomérase ; Vald : aldolase ; Vglyco : phosphoglycérate ; Vpep : énalase ; Vpk : pyruvate kinase ; Vp<sub>pyr</sub> : transport de pyruvate ; Vpdh : pyruvate déshydrogénase ; Vcs : citrate synthase ; Vca : aconitase ; Viso : isocitrate déshydrogénase ; Vsf<sub>a</sub> : cétoglutarate déshydrogénase ; Vf<sub>um1/2</sub> : succinate déshydrogénase ; Vf<sub>um</sub> : fumarase ; Vmdh : malate déshydrogénase ; Vme : pyruvate carboxylase ; Vasp : Aspartate transaminase ; Vaspeff : asparagine synthétase ; Vthr : homosérine kinase ; Vthreff : thréonine synthase ; Vile : dihydroxyacide déshydratase ; Vileeff : acide aminés aminotransférase ; Vlys : dihydrodipicolinate synthase/réductase ; Vlyseff : diamino pimélate décarboxylase ; Vakg : glutamate déshydrogénase ; Vglueff : glutamate synthase ; Vgl : glutamate synthase ; Vpro : glutamyl kinase ; Vproeff : pyrroline-5-carboxylase réductase ; Va : entrée de glutamine ; Vfas2 (a/b) : glycérol 3-phosphate déshydrogénase ; Vtcp : transporteur de triose phosphate entre le cytosol au chloroplaste ; Vpep : Transporteur de pep du cytosol vers le chloroplaste ; Vstsp/Vsta : enzyme branchante ; Valdp : aldolase plastidial ; Vglycp : phosphoglycérate plastidial ; Vpkp : pyruvate kinase plastidial ; Vpdhp : pyruvate déshydrogénase plastidial ; Vfas1 : acétyl-CoA carboxylase plastidial ; Vval/Vvaleff : synthèse valine ; Vala/alaeff : alanine-ketoisovalérate aminotransférase ; Vleu1 : isopropylmalate synthase/isomérase /déshydrogénase ; Vleu : isopropylmalate déshydrogénase ; Vleueff : amino acide aminotransférase ; Vser : phosphosérine aminotransférase ; Vsereff : phosphosérine phosphatase ; Vgly/Vglyeff : glycine hydroxyméthyltransférase ; Varo : chorismate synthase ; Vphe : chorismate mutase ; Vpheeff : préphenate déshydratase ; Vtyreff : préphenate déshydrogénase ; Vpp1 : gluconate déshydrogénase ; Vpp2 : transcetolase ; Vpp3 : transaldolase ; Vpp4 : DHAP synthase ; Vhis : ribose phosphate pyrophosphokinase ; Vhiseff : histidinal déshydrogénase.

L'épaisseur des flèches représente l'importance des flux métaboliques. Les valeurs de flux sont indiquées en nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>.



Milieu de culture / Albumen



### 3.2.2.3.1. Voie conduisant à la synthèse des acides gras.

L'analyse des flux métaboliques et des enrichissements isotopiques des différents métabolites présents dans les embryons de la lignée *Astral* a montré que le glucose est le précurseur carboné principal assurant la synthèse des acides gras (**Figure 67**). Le flux de carbone permettant la synthèse des acides gras passe majoritairement par la glycolyse cytosolique jusqu'au PEP cytosolique. Ce PEP cytosolique est transporté dans le plaste en PEPp ( $V_{pep} : 43 \pm 3 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) pour être converti en PYRp puis en AcCoAp, précurseur de la synthèse des acides gras. Les carbones enrichis en carbone 13 du fragment de Mc Lafferty proviennent du PYRp (100 mol %) synthétisé exclusivement à partir du PEPp (**Figure 67**).

Le PEPp est également formé minoritairement à partir des Tpp ( $V_{glycp} : 12 \pm 3 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) minoritairement. En effet, il est estimé que 78,5 mol% des carbones du PEPp proviennent du PEPc ( $V_{pep} : 43 \pm 3 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) dérivé du catabolisme des hexoses par les réactions de la glycolyse cytosolique, alors que 21,5 mol% des carbones du PEPp proviennent des trioses phosphates plastidiaux (Tpp) ( $V_{glycp} : 12 \pm 3 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) importés des trioses phosphates cytosoliques (TP). Ce résultat montre donc qu'un flux minoritaire permet la conversion des Tpp en PEPp (**Figure 67 ; annexe 10**). Ce résultat est en accord avec l'analyse protéomique effectuée sur des embryons de lin au cours de la synthèse des acides gras par Barvkar *et al.* en 2012. Ces auteurs ont montré que deux enzymes de la glycolyse plastidiale, la 2,3-bisphosphoglycérate indépendante (PGAM) et l'énolase, permettaient la conversion des Tpp en PEPp. Ces auteurs ont aussi montré que ces enzymes ne sont pas présentes dans les plastes, alors qu'elles sont fonctionnelles dans le cytosol.

Les enzymes de la glycolyse cytosolique et le transporteur assurant le transport du PEP du cytosol (PEPc) vers le plaste (PEPp) semblent être très importantes pour la synthèse des acides gras, dans les embryons de lin. Ces résultats sont similaires aux analyses des flux métaboliques déterminées dans les embryons de la famille des Brassicacées (*Arabidopsis thaliana* : Lonien et Schwender, 2009; colza : Schwender *et al.*, 2003) mais sont différentes de celle des flux métaboliques déterminés dans les embryons de tournesol (Alonso *et al.*, 2007), de soja (Sriram *et al.*, 2004 ; Iyer *et al.*, 2008 ; Allen *et al.*, 2009) ou de maïs (Alonso *et al.*, 2010). En effet, les analyses des flux métaboliques dans les embryons d'*Arabidopsis*

*thaliana* (Lonien et Schwender, 2009) et de colza (**Synthèse bibliographique- Chapitre 2, Figure 12**) ont montré que le flux de carbone permettant la synthèse de l'acétyl-CoA passe majoritairement par la glycolyse cytosolique jusqu'au PEPc qui est alors transporté vers le plaste pour être converti en PYRp puis en acétyl-CoAp.

Des différences entre le modèle lin et colza/*Arabidopsis thaliana* subsistent toutefois. En effet, dans les embryons de colza et d'*Arabidopsis thaliana*, la production de PYRp provient majoritairement du PEPp par la pyruvate kinase plastidiale (colza : 74 mol % ; *Arabidopsis thaliana* : 73 à 88 mol %), mais pas exclusivement comme dans le cas du lin (100 mol %). En effet, les travaux effectués sur le colza et *Arabidopsis thaliana* ont montré que le PYRp peut être généré par des imports de pyruvate du cytosol vers le plaste (colza : 26 mol % ; *Arabidopsis thaliana* : 10 à 25 mol %), ou par l'enzyme malique conduisant à la formation de PYRp à partir de malate (*Arabidopsis thaliana* : 2 mol %) (**Tableau XXXVII**).

Dans le cas du lin, un transporteur du PYRc à PYRp n'a pas été identifié dans les analyses transcriptomiques (Venglat *et al.*, 2011) ou protéomiques (Bravkar *et al.*, 2012 ; Klubicová *et al.*, 2013) et n'a donc pas été pris en compte dans le modèle élaboré. Ce transporteur n'a d'ailleurs pas été pris en compte lors de l'analyse des flux métaboliques dans les embryons de soja (Sriram *et al.*, 2004 ; Iyer *et al.*, 2008 ; Allen *et al.*, 2009), tournesol (Alonso *et al.*, 2007) et maïs (Alonso *et al.*, 2010) en raison du manque général de preuves moléculaires générales pour un tel transporteur dans les plantes (O'grady *et al.*, 2012).

Dans notre modèle, l'enzyme malique a été contrainte à une valeur de 0, car lors des analyses des enrichissements isotopiques des différents composés après culture en présence de 100 % de [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-glutamine, le fragment de Mc Lafferty de l'acide palmitique n'a pas été enrichi en carbone 13, alors que le malate l'a été (**Résultats et Discussions-Chapitre 3, &2.1.**).

**Tableau XXXVII : Origine des précurseurs et des cofacteurs métaboliques pour la synthèse des huiles dans les embryons d'oléagineux d'après O'grady *et al.*, (2012).**

Les données sont extraites des études d'analyse des flux métaboliques au carbone 13 d'embryons de diverses espèces et génotypes. 3-PGA, l'acide phosphoglycérique; NC, la réaction n'a pas été considéré dans le modèle de flux; OPP, la voie oxydative des pentoses phosphates. a Iyer *et al.*, 2008. b Sriram *et al.*, 2004. c Allen *et al.*, 2009. d Schwender *et al.*, 2003. e Schwender *et al.*, 2004. f Schwender *et al.*, 2006. g Lonien et Schwender, 2009. h Alonso *et al.*, 2007. i Alonso *et al.*, 2010).

Oilseed species	Soy <sup>a,b</sup>	Soy <sup>c</sup>	Rapeseed <sup>d-f</sup>	Arabidopsis thaliana <sup>g</sup>		Sunflower <sup>h</sup>	Maize <sup>i</sup>
Cultivar/genotype	cv. Evans	cv. Amsoy	cv. Reston	Ws/pkp (wt vs. low-oil mutant)	Col/wri (wt vs. low-oil mutant)	cv. Ames 7576	LH 59
Conditions for embryo culture (temp; light; duration)	12 °C/ 20 °C/ 27 °C; 100 µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ; 6 d	27 °C; 35 µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ; 14 d	20 °C; 50 µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ; 14 d	21 °C; 50 µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ; 7 d	21 °C; 50 µmol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ; 7 d	25 °C; dark; 5 d	25 °C; dark; 7 d
Organic nutrients	Sucrose/ Gln	Sucrose/ Glc/ Gln/ Asn	Sucrose/ Glc/ Ala/ Gln	Sucrose / Ala/Gln	Sucrose / Ala/Gln	Glc/Gln	Glc/Fructose/ Gln
Oil content in cultivated embryos (% of dry weight)	16 <sup>b</sup>	18	38 <sup>f</sup>	45/20	47/13	40	34
Rubisco bypass (3-PGA generated by Rubisco; mol%)	NC	25/NC <sup>k,j</sup>	46-75 <sup>e</sup>	82/118	91/138	NC	NC
Generation of plastidic pyruvate, the precursor for <i>de novo</i> fatty acid synthesis <sup>l</sup>			45 <sup>f</sup>				
Pyruvate generated by plastidic pyruvate kinase (mol%)	-	-	74	73/73	88/33	93	70
Pyruvate generated by import from cytosol (mol%)	-	-	26	25/21	10/53	NC	NC
Pyruvate generated from plastidic malic enzyme (mol%)	-	-	NC	2/7	2/14	7	30
Production of energy cofactors, relative to demands of storage synthesis							
ATP production by TCA cycle activity via oxidative phosphorylation, relative to biosynthetic demands (mol%)	154 <sup>b,k</sup>	80	22	60; 100	71; 262	>100	200 <sup>k</sup>
NADPH production by OPPP activity, relative to demands of fatty acid synthesis (mol%)	200-350 <sup>b,k</sup>	NC/24 <sup>k,j</sup>	38 <sup>d</sup>	OPPP flux estimates not reliable	OPPP flux estimates not reliable	106 <sup>k</sup>	76 <sup>k</sup>
NADPH production by plastidic malic enzyme, relative to demands of fatty acid synthesis (mol%)		29/27 <sup>k,j</sup>	NC			7	30

### 3.2.2.3.2. Origine des cofacteurs nécessaires à la synthèse des acides gras.

La synthèse des acides gras nécessite des cofacteurs l'ATP, du NADPH et du NADH. La demande de ces cofacteurs pour la synthèse des acides gras correspond au flux nécessaire à la synthèse des acides gras (Vfas 1 ; Alonso *et al.*, 2010). La demande en NADPH, NADH et en ATP est évaluée à 51,4±0,1 nmol NADPH.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>, 51,4±0,1 nmol NADH.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup> et à 51,4±0,1 ATP.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>.

➤ Le NADPH.

Le NADPH est produit par les réactions de la voie oxydative des pentoses phosphates, par l'enzyme malique ou les réactions de la phase claire de la photosynthèse (Ruuska *et al.*, 2004 ; Schwender *et al.*, 2004, 2006 ; Goffman *et al.*, 2005). La réaction de l'enzyme malique à NADP dépendant, libère une mole de NADPH, alors que la réaction oxydative des pentoses phosphates libère 2 moles de NADPH. Ainsi la vitesse de synthèse du NADPH peut être estimée par les vitesses des réactions de l'enzyme malique ( $V_{mep}$ ) et de la voie oxydative des pentoses phosphates ( $V_{pp1}$ ).

Dans notre modèle, nous n'avons pas pu estimer la vitesse de synthèse du NADPH par les réactions de la photosynthèse et la vitesse de synthèse de l'enzyme malique a été contrainte à 0. La vitesse de synthèse du NADPH dans les plastes a donc pu être estimée par la réaction de la voie oxydative des pentoses phosphates ( $V_{pp1}$ ). L'analyse des flux métaboliques dans les embryons de lin a montré que le NADPH synthétisé dans les plastes se fait avec une vitesse de  $68 \text{ nmol NADPH.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$  par la voie oxydative des pentoses phosphates ( $V_{pp1}$ ) (**Figure 67 ; Annexe 10**). La vitesse de synthèse de NADPH par la voie oxydative des pentoses phosphates ( $V_{pp1} : 68 \text{ nmol NADPH.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) est supérieure à la demande requise pour la biosynthèse des acides gras ( $V_{fas1} : 51,4 \pm 0,1 \text{ nmol NADPH.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) soit 132,3 mol% de la demande en NADPH pour la synthèse des acides gras *de novo*. Or dans les embryons photosynthétiques tels que ceux de colza (Schwender *et al.*, 2003) et de soja (Allen *et al.*, 2009), le NADPH produit par la voie oxydative des pentoses phosphates ne couvre pas totalement la demande requise pour la biosynthèse des acides gras puisque la production de NADPH par la voie oxydative des pentoses phosphates relative à la demande en acides gras est estimée à 24 mol % pour le soja (Allen *et al.*, 2009) et à 38 mol % pour le colza (**Tableau XXXVII**). Les auteurs ont supposé que dans les embryons de plantes photosynthétiques, l'apport majoritaire du NADPH pour la synthèse des acides gras s'effectue par la réaction dépendante de la lumière de la photosynthèse (O'grady *et al.*, 2012). Ce résultat semblerait montrer que l'activité photosynthétique dans les embryons de lin n'est pas active. Les résultats obtenus pour le soja par Allen *et al.* (2009) sont toutefois contradictoires avec ceux obtenus par deux autres études de fluxomique menées sur le soja par Sriram *et al.* (2004) et Iyer *et al.* (2008). En effet, ces auteurs évaluent la production de NADPH par la voie oxydative des pentoses phosphates supérieure (200 à 350 mol %) à la demande en acides gras (**Tableau XXXVII**). Pour les embryons non photosynthétiques, les

résultats ont montré que la production de NADPH par la voie des pentoses phosphates est proche de la demande en acides gras puisque cette production de NADPH relative à la demande en acides gras a été estimée à 106 mol % pour le tournesol (Alonso *et al.*, 2007) et à 76 mol % pour le maïs (Alonso *et al.*, 2010) (**Tableau XXXVII**).

➤ Le NADH.

Dans les plastes des embryons des graines oléagineuses, le NADH est produit par les réactions de la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (Vglycp) et de la pyruvate déshydrogénase (Vpdhp). Ces réactions génèrent chacune une mole de NADH (Smith *et al.*, 1992 ; Pleite *et al.*, 2005). Les vitesses de synthèse du NADH dans les plastes peuvent donc être évaluées à partir des vitesses de synthèses de ces deux réactions. Nos résultats indiquent que la vitesse de synthèse de NADH dans les plastes par la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase plastidiale et par la pyruvate déshydrogénase est estimée à 63,2 nmol NADH.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup> et donc supérieure à la demande de la synthèse *de novo* d'acides gras estimée à 51,4±0,1 nmol NADH.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>. Dans les embryons photosynthétiques et dans les embryons non photosynthétiques, ces réactions suffisent à l'apport de NADH pour la synthèse des acides gras et ne constituent pas des facteurs limitant à la synthèse des acides gras.

Le NADH est produit également dans les mitochondries par les réactions du cycle de Krebs, l'isocitrate déshydrogénase (Viso), la malate déshydrogénase (Vmdh), la cétoglutarate déshydrogénase (Vakg), la succinate déshydrogénase (Vfum1/2) et les réactions de la glycolyse cytosolique, de la pyruvate déshydrogénase (Vpdh) et de la glyceraldéhyde 3-P-déshydrogénase (Vglyco). Dans les embryons de lin, la vitesse de synthèse du NADH dans les mitochondries par les réactions de la glycolyse cytosolique a été estimée à 305,1 nmol NADH.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>, soit 2 fois plus que dans le plaste. L'oxydation de 2 moles de NADH nécessite 1 mole d'oxygène et une consommation de 152,55 nmol O<sub>2</sub>.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>. Toutefois, la mesure de la consommation d'oxygène n'a pas été effectuée dans les embryons de lin durant la période d'incubation et ne peut être comparée à la teneur mentionnée.

➤ L'ATP.

La synthèse des acides gras nécessite également de l'ATP qui est estimé pour cette synthèse des acides gras à 51,4 ± 0,1 nmol ATP.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>. Dans les plastes, les réactions de la pyruvate kinase (Vpkp) et de la phosphoglycérate kinase (Vglycp) permettent chacune

la synthèse d'une mole d'ATP (Alonso *et al.*, 2010). La vitesse de synthèse de l'ATP dans les plastes peut être estimée à partir des vitesses des réactions  $V_{pkp}$  et  $V_{glycp}$ .

L'analyse des flux métaboliques dans les embryons de la lignée *Astral* a montré que la vitesse de synthèse estimée d'ATP de  $V_{pkp}$  et  $V_{glycp}$  ( $63,9 \text{ nmol ATP.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) est supérieure à la demande estimée en ATP pour la synthèse des acides gras dans les embryons de la lignée *Astral* ( $51,4 \pm 0,1 \text{ nmol ATP.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ). Les réactions de la pyruvate kinase et de la phosphoglycérate kinase pourraient suffire à la demande en ATP pour la synthèse des acides gras dans les embryons de maïs (Alonso *et al.*, 2010).

#### 3.2.2.4. Limitations de ce travail.

L'analyse des flux métaboliques dans les embryons de la lignée *Astral* a montré que les vitesses de synthèse des acides aminés dérivant de l'oxaloacétate (l'acide aspartique, l'isoleucine, la lysine) et de la pyruvate plastidiale (valine, alanine, leucine) sont faibles et correspondent aux bornes inférieures ( $0,1 \pm 0 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) des valeurs de contraintes imposées au réseau. Or ces valeurs imposées sont des valeurs théoriques provenant des quantifications des acides aminés dans les graines de lin provenant des données de la littérature (Morris, 2007). Ces valeurs peuvent présenter des imprécisions dans le modèle. Dans les graines matures de lin, l'acide aspartique ( $9,3 \text{ g}/100 \text{ g}$  de protéines) est un acide aminé très abondant dans les protéines alors que l'isoleucine ( $4,0 \text{ g}/100 \text{ g}$  de protéines) et la lysine ( $4,0 \text{ g}/100 \text{ g}$  de protéines) sont des acides aminés présents à des quantités plus faibles (Morris, 2007). Dans nos expériences, les flux obtenus pour les synthèses de l'acide aspartique ( $V_{aspeff} : 0 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ), de l'isoleucine ( $V_{ileeff} : 0,1 \pm 0 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) et de la lysine ( $V_{lyseff} : 0,1 \pm 0 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) semblent être très faibles (Figure 14). Ces acides aminés sont synthétisés à partir de l'oxaloacétate. Or, nos analyses ont montré que la vitesse de synthèse de l'oxaloacétate est très importante ( $V_{mdh} : 60 \pm 1 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ). L'absence de mesures des flux extracellulaires et de données d'enrichissements isotopiques de l'acide aspartique, de l'isoleucine et de la lysine, engendre une sous-détermination du réseau pour le calcul de ces flux métaboliques.

Dans les graines matures de lin, les teneurs en acides aminés provenant de la pyruvate plastidiale tels que la valine :  $4,7 \text{ g}/100 \text{ g}$  de protéines, l'alanine :  $4,5 \text{ g}/100 \text{ g}$  de protéines, la leucine :  $5,9 \text{ g}/100 \text{ g}$  de protéines, sont très faibles (Morris, 2007). Les flux de synthèses pour ces acides aminés (valine ( $V_{valeff}$ ):  $0,1 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ); alanine ( $V_{alaeff}$ ) :  $0,1 \text{ nmol.h}^{-1}.$

$^1$ .embryon $^{-1}$ , leucine (Vleueff): 0,1 nmol.h $^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ) semblent être aussi très faibles. L'ajout de données mesurées (vitesse de synthèse et données d'enrichissements spécifiques de la lignée *Astral*) pourraient permettre d'affiner la carte de flux pour ces valeurs, puisqu'ils ont pris les valeurs imposées par l'expérimentateur à partir des données de la littérature.

### **3.3. Comparaison des flux métaboliques dans les embryons des deux lignées sélectionnées.**

Les lignées *Astral* et 238 ont été sélectionnées pour une production d'huile différente accumulant respectivement 44,6±0,2 et 37,0±0,7 g/100gMS dans leurs graines. Afin d'étudier le comportement métabolique de ces deux variétés de lin oléagineux pour l'accumulation de leurs réserves, une comparaison des flux métaboliques dans les embryons de ces deux lignées a été entreprise. Pour effectuer cette comparaison, il a été nécessaire, dans un premier temps d'obtenir les cartes de flux métaboliques pour la lignée de lin 238.

#### **3.3.1. Obtention des flux métaboliques dans les embryons de lin 238.**

Afin d'effectuer la comparaison des flux métaboliques dans les embryons de la lignée 238 et les comparer avec ceux obtenus par *Astral*, des embryons de lin 238 ont été récoltés à 16 JAF (début de la synthèse des composés de réserves) puis incubés dans un milieu de culture contenant 80 % de [U-13C<sub>6</sub>] glucose, 20 % de [2-13C<sub>1,2</sub>] glucose et 100 % de glutamine non marquée. Les incubations ont été effectuées pendant 168 heures afin d'atteindre l'état métabolique et isotopique stationnaire (**Chapitre 1: Partie 1**). Dans ces expériences, les embryons de la lignée *Astral* ont été incubés dans un milieu de culture contenant 60 % de [U-13C<sub>6</sub>]-glucose et 40 % de [2-13C<sub>1,2</sub>]-glucose et 100 % de glutamine non marquée alors que les embryons de la lignée 238 ont été incubés dans un milieu de culture contenant 80 % de [U-13C<sub>6</sub>] glucose, 20 % de [2-13C<sub>1,2</sub>] glucose et 100 % de glutamine non marquée. Dans ces expériences, les substrats marqués et non marqués sont toujours utilisés en excès et nous avons vérifié que la différence de proportion entre le [U-13C<sub>6</sub>] glucose et le [2-13C<sub>1,2</sub>] glucose n'avait pas d'impact sur le marquage des composés. Une partie des embryons incubés ont été récoltés puis lavés. Les métabolites ont été extraits comme décrits précédemment et les enrichissements isotopiques déterminés sur l'unité de l'acétyl-CoA de l'acide palmitique, les sucres libres (glucose, fructose), l'amidon et les acides organiques (succinate, fumarate, citrate, malate). Ces données expérimentales (**Annexe 11**) sont introduites dans la partie « MASS SPECTROMETRY » du fichier ftbl.

La consommation du glucose et de la glutamine présente dans le milieu de culture s'effectue avec des vitesses respectives de  $380 \pm 40$  nmol de glucose. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$  et de  $25 \pm 2$  nmol de glutamine. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ , par les embryons de la lignée 238 (**Tableau XXXVIII**). La quantification des huiles, de l'amidon et des acides aminés (glutamate, sérine, glycine, thréonine, phénylalanine, proline et histidine) dans les embryons de lin 238 incubés dans le milieu de culture pendant 168 heures a montré que la vitesse de synthèse des huiles ( $V_{fas1} : 49,7 \pm 0,5$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ) est la plus importante par rapport aux vitesses de synthèse des autres composés tout comme pour la lignée *Astral*. Les vitesses de synthèse de l'amidon ( $V_{sta} : 4 \pm 1$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ), du glutamate ( $V_{glueff} : 1,21 \pm 0,01$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ), de la sérine ( $V_{sereff} : 4,52 \pm 0,01$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ), de la glycine ( $V_{glyeff} : 4,8 \pm 0,1$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ), de la thréonine ( $V_{threff} : 0,53 \pm 0,01$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ), de la phénylalanine ( $V_{pheeff} : 0,65 \pm 0,01$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ), de la proline ( $V_{proeff} : 1,1 \pm 0,1$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ) et de l'histidine ( $V_{hiseff} : 5,0 \pm 0,1$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ) sont inférieures à la vitesse de synthèse des acides gras (**Tableau XXXVIII**).

**Tableau XXXVIII : Flux extracellulaires mesurés (nmol.h $^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ).**

Vg : vitesse d'importation de glucose ; Vthreff : thréonine synthase ; Va : entrée de glutamine ; Vsta : enzyme branchante ; Vfas1 : acétyl-CoA carboxylase Vglueff : glutamate synthase ; Vsereff : phosphosérine phosphatase ; Vglyeff : glycine hydroxyméthyltransférase ; Vpheeff : préphenate déshydratase ; Vhiseff : histidinal déshydrogénase.

Réactions	238	
	Moyenne	Ecart type
<b>Vg</b>	380	40
<b>Va</b>	25	2
<b>Vsta</b>	4	1
<b>Vfas1</b>	49,7	0,5
<b>Vglueff</b>	1,21	0,01
<b>Vsereff</b>	4,52	0,01
<b>Vglyeff</b>	4,8	0,1
<b>Vthreff</b>	0,53	0,01
<b>Vpheeff</b>	0,65	0,01
<b>Vproeff</b>	1,1	0,1
<b>Vhiseff</b>	5,0	0,1

Les vitesses de synthèse de ces différents composés ont été intégrées dans le fichier ftbl dans la section « FLUX MEASUREMENTS ». Les réactions placées dans la partie « NETWORK » ainsi que les contraintes « EQUALITIES » et « INEQUALITIES » sont les mêmes que pour la lignée *Astral*. Le calcul des flux a été effectué de la même manière que pour la lignée *Astral* (&3.2.3.). Afin de simplifier l'analyse, seuls, les valeurs de flux net ont été placées sur la carte de flux métabolique en utilisant le logiciel CellDesigner 4.4 (**Figure 68**).





**Figure 68 : Flux métaboliques (nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>) dans les embryons de la lignée 238.**

**Métabolites :** GLNext : glutamine externe ; GLN : glutamine ; GLU : glutamate ; PRO : proline ; AKG : cétoglutarate ; SUCC : succinate ; FUM : fumarate ; MAL : malate ; OAA : oxaloacetate ; ICIT : isocitrate ; CIT : citrate ; AcCoA : acétyl-CoA ; PYRm : pyruvate mitochondriale ; ASP : aspartate ; THR : thréonine ; ILE : isoleucine ; LYS : lysine ; PYRc : pyruvate cytosolique ; PEP : phosphoenolpyruvate cytosolique ; TP : triose phosphate ; G3P : glycéraldéhyde-3-phosphate ; F6P : fructose-6-phosphate ; G6P : glucose-6-phosphate ; WALL : composés pariétaux ; GLC ext : glucose externe ; GLC : glucose ; STA : amidon ; H6Pp : hexose phosphate plastidial ; TPp : triose phosphate plastidiale ; PEPp : phosphoenolpyruvate plastidiale ; PYRp : pyruvate plastidial ; AcCoAp : acétylCoA plastidiale ; ARO : intermédiaires aromatiques ; TYR : tyrosine ; PHE : phénylalanine ; ALA : alanine ; LEU1 : intermédiaire de la voie de biosynthèse de la leucine ; LEU : leucine ; VAL : valine ; GLY : glycine ; SER : sérine ; HIS : histidine ; P5Pp : ribose-5-phosphate ; S7Pp : Sedoheptulose 7-Phosphate ; E4Pp : érythrose-4-phosphate plastidiale ; CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone ; Les métabolites comportant le suffixe eff sont les métabolites dosés. **Enzymes :** Vg : import de glucose ; Vhk1 : hexokinase ; Vgf : phosphoglucose isomérase ; Vald : aldolase ; Vglyco : phosphoglycérate ; Vpep : énonase ; Vpk : pyruvate kinase ; Vpyr : transport de pyruvate ; Vpdh : pyruvate déshydrogénase ; Vcs : citrate synthase ; Vca : Aconitase ; Viso : Isocitrate déshydrogénase ; Vsfa : cétoglutarate déshydrogénase ; Vfum1/2 : succinate déshydrogénase ; Vfum : fumarase ; Vmdh : malate déshydrogénase ; Vme : pyruvate carboxylase ; Vasp : aspartate transaminase ; Vaspeff : asparagine synthétase ; Vthr : homosérine kinase ; Vthreff : thréonine synthase ; Vile : dihydroxyacide déshydratase ; Vileeff : acide aminés aminotransférase ; Vlys : dihydrodipicolinate synthase/réductase ; Vlyseff : diamino pimelate décarboxylase ; Vakg : glutamate déshydrogénase ; Vglueff : glutamate synthase ; Vgl : glutamate synthase ; Vpro : glutamyl kinase ; Vproeff : pyrroline-5-carboxylase réductase ; Va : entrée de glutamine ; Vfas2 (a/b) : glycérol 3-phosphate déshydrogénase ; Vtcp : transporteur de triose phosphate entre le cytosol au chloroplaste ; Vpep : transporteur de pep du cytosol vers le chloroplaste ; Vstsp/Vsta : enzyme branchante ; Valdp : aldolase plastidial ; Vglycp : phosphoglycérate plastidial ; Vpkp : Pyruvate kinase plastidial ; Vpdhp : pyruvate déshydrogénase plastidial ; Vfas1 : Acétyl-CoA carboxylase plastidial ; Vval /Vvaleff : synthèse valine ; Vala/alaeff : alanine-ketoisovalérate aminotransférase ; Vleu1 : isopropylmalate synthase/isomérase/déshydrogénase ; Vleu : isopropylmalate déshydrogénase ; Vleueff : amino acide aminotransférase ; Vser : phosphosérine aminotransférase ; Vsereff : phosphosérine phosphatase ; Vgly/Vglyeff : glycine hydroxyméthyltransférase ; Varo : chorismate synthase ; Vphe : chorismate mutase ; Vpheeff : préphénate déshydratase ; Vtyreff : préphénate déshydrogénase ; Vpp1 : gluconate déshydrogénase ; Vpp2 : transcétolase ; Vpp3 : transaldolase ; Vpp4 : DHAP synthase ; Vhis : ribose phosphate pyrophosphokinase ; Vhiseff : histidinal déshydrogénase. L'épaisseur des flèches représente l'importance des flux métaboliques. Les valeurs de flux sont indiquées en nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>.

L'analyse des flux métaboliques et des données d'enrichissements des métabolites des embryons de la lignée 238 après culture en présence de substrats marqués (**Figure 68**) a montré que le glucose est le précurseur assurant la synthèse des acides gras. En effet, l'analyse des enrichissements isotopiques après incubation des embryons de lin 238 dans un milieu de culture contenant 100% [U-<sup>13</sup>C<sub>5</sub>]-glutamine n'a pas montré d'enrichissement du fragment de Mc Lafferty, mais des acides organiques, confirmant que pour le lin l'enzyme malique ne contribue pas à la synthèse des acides gras (**Annexe 11**). Le flux de carbone permettant la synthèse des acides gras passe majoritairement par la glycolyse cytosolique jusqu'au TP cytosolique. Le TP cytosolique est transporté dans le plaste en TPp (Vtcp : 80±5 nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>) pour être converti en PEPp puis en PYRp. Les carbones enrichis en carbone 13 du fragment de Mc Lafferty proviennent du PYRp (100 mol %) synthétisé exclusivement à partir du PEPp (**Figure 68**). Le PEPp est formé à partir des TPp (Vglycp : 46±4 nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>) et du PEPc (Vpep : 6±4 nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>). Il est estimé que pour la lignée 238, 11,7 mol% des carbones du PEPp proviennent du PEPc dérivé du catabolisme des hexoses par les réactions de la glycolyse cytosolique, alors que 88,2 mol% des carbones du PEPp proviennent des trioses phosphates plastidiaux (TPp) importés des trioses phosphates cytosoliques (TP).

### 3.3.2. Comparaison des flux métaboliques dans les embryons des deux lignées sélectionnées.

#### 3.3.2.1. Différences observées dans la détermination des flux extracellulaires.

Pour les deux lignées, une consommation de glucose de  $330 \pm 10$  et de  $380 \pm 40$  nmol de glucose. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$  a été observée respectivement pour *Astral* et 238. La glutamine présente dans le milieu d'incubation a été consommée à une vitesse de  $21 \pm 6$  et de  $25 \pm 2$  nmol de glutamine. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$  respectivement par les lignées *Astral* et 238. La quantification des flux de synthèse dans les embryons des lins *Astral* et 238 incubés dans le milieu de culture pendant 168 heures a montré que la vitesse de synthèse des huiles ( $V_{fas1}$ ) est plus importante dans les embryons *Astral* ( $54 \pm 3$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ) que dans les embryons de la lignée 238 ( $49,7 \pm 0,5$  nmol. $h^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ) (Tableau XXXIX).

**Tableau XXXIX : Flux extracellulaires mesurés (nmol.h $^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ).**

Vg : vitesse d'importation de glucose ; Vthreff : thréonine synthase ; Va : entrée de glutamine ; Vsta : enzyme branchante ; Vfas1 : acétyl-CoA carboxylase Vglueff : glutamate synthase ; Vsereff : phosphosérine phosphatase ; Vglyeff : glycine hydroxyméthyltransférase ; Vpheeff : préphenate déshydratase ; Vhiseff : histidinal déshydrogénase.

Réactions	<i>Astral</i>		238	
	Moyenne	Ecart type	Moyenne	Ecart type
<b>Vg</b>	330	10	380	40
<b>Va</b>	21	6	25	2
<b>Vsta</b>	1,6	0,7	4	1
<b>Vfas1</b>	54	3	49,7	0,5
<b>Vglueff</b>	0,07	0,24	1,21	0,02
<b>Vsereff</b>	3,9	0,1	4,52	0,01
<b>Vglyeff</b>	7,2	0,2	4,8	0,1
<b>Vthreff</b>	0,44	0,04	0,53	0,01
<b>Vpheeff</b>	1,2	0,2	0,65	0,01
<b>Vproeff</b>	1,40	0,04	1,1	0,1
<b>Vhiseff</b>	4,88	0,01	5,0	0,01

Pour ces deux lignées, l'assimilation des substrats (glucose et glutamine) s'est effectuée de la même façon indiquant que les transporteurs de ces composés existent et sont fonctionnels au niveau membranaire dans les embryons de ces deux lignées. La différence de teneurs en huile dans les embryons des deux lignées de lin ne semble pas tributaire des mécanismes liés à l'importation de molécules carbonées dans les embryons, mais plutôt due à une redirection du flux de carbone vers la synthèse d'autres composés.

L'analyse des teneurs en amidon dans les embryons de lin incubés dans le milieu de culture a montré une synthèse d'amidon (Vsta) plus importante chez la lignée 238 ( $4 \pm 1 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) que chez la lignée *Astral* ( $1,6 \pm 0,7 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ). Or, l'analyse biochimique dans des embryons de lin 238 avait indiqué une consommation d'amidon durant cette période (**Résultats et Discussions-Chapitre 1, & 1.4.6**), alors qu'une synthèse a été observée lors de la culture d'embryons de lin 238. Toutefois, ces résultats de flux sembleraient être en accord avec ceux mentionnés dans la littérature (Venglat *et al.*, 2011) et pourrait montrer une accumulation plus importante d'amidon dans les embryons de lin. L'analyse statistique effectuée sur les teneurs en amidon dans les embryons matures des deux lignées de lin n'a toutefois pas montré de différence significative (**Résultats et Discussions-Chapitre 1-Figure 42**).

Par la quantification des acides aminés issus de l'hydrolyse des protéines dans les embryons de lin incubés pendant 168 heures, une vitesse de synthèse du glutamate ( $1,21 \pm 0,02 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ), de la sérine ( $4,52 \pm 0,01 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ), de la thréonine ( $0,53 \pm 0,01 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) et de l'histidine ( $5,04 \pm 0,01 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) plus importante a été enregistrée chez la lignée 238 que chez la lignée *Astral*. En effet, la vitesse de synthèse du glutamate est de  $0,1 \pm 0,2 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ , celles de la sérine de  $3,9 \pm 0,1 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ , de la thréonine de  $0,44 \pm 0,04 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$  et de l'histidine de  $4,88 \pm 0,01 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$  dans les embryons de la lignée *Astral*. Or, les quantifications de ces acides aminés dans les embryons âgés de 16, 24, 32 JAF des deux lignées de lin lors de l'analyse biochimique (**Résultats et Discussions-Chapitre 1, & 1.4.5**) ont montré une accumulation significativement ( $p < 0,05$ ) plus importante du glutamate et de l'histidine durant la phase de synthèse des acides gras. Ces résultats pourraient indiquer une redirection du flux de carbone vers la synthèse de ces acides aminés au détriment de la synthèse des acides gras dans les embryons de la lignée 238 par rapport aux embryons de la lignée *Astral*.

La lignée accumulant le plus d'huile dans ses embryons (*Astral*) présente des vitesses de synthèse pour la glycine ( $7,2 \pm 0,2 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ), la phénylalanine ( $1,2 \pm 0,2 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) et la proline ( $1,40 \pm 0,04 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) plus élevées que celles de ces mêmes composés dans les embryons de la lignée 238. En effet, la vitesse de synthèse de la glycine est de  $4,8 \pm 0,1 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ , celle de la phénylalanine de  $0,65 \pm 0,01 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ .

$^1$ .embryon $^{-1}$  et celle de la proline est de  $1,08 \pm 0,02$  nmol.h $^{-1}$ .embryon $^{-1}$ . Toutefois, les embryons des deux lignées de lin lors de l'analyse biochimique (**Résultats et Discussions-Chapitre 1, & 1.4.5**) n'ont pas présenté de différences significatives d'accumulation de ces acides aminés dans les embryons.

### 3.3.2.2. Différence des flux métaboliques entre la lignée *Astral* et la lignée 238.

#### 3.3.2.2.1. Synthèse des acides gras.

L'analyse des flux métaboliques et des données d'enrichissement des métabolites des embryons dans les lignées 238 et *Astral* après culture en présence de substrats marqués (**Figure 68 et Figure 69**) indique que le glucose est le précurseur principal permettant la synthèse des acides gras. Dans les deux cas, il a été noté que le précurseur de l'acétyl-CoA, le PYRp provient exclusivement du PEPp. La différence de vitesse de synthèse des acides gras *de novo* dans les embryons de lin *Astral* ( $V_{fas1} : 54 \pm 3$  nmol.h $^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ) et 238 ( $V_{fas1} : 49,7 \pm 0,5$  nmol.h $^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ) est donc due à une différence de synthèse du PEPp dans les embryons des deux lignées de lin.

En effet, les résultats indiquent des différences de vitesses de synthèses du PEPp dans les embryons des deux lignées de lin. Pour la lignée *Astral*, la synthèse du PEPp s'effectue majoritairement à partir du PEPc ( $V_{pep} : 43 \pm 3$  nmol.h $^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ) et minoritairement à partir du Tpp ( $V_{glycp} : 12 \pm 3$  nmol.h $^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ). La vitesse de synthèse du PEPp à partir du PEPc est supérieure dans les embryons de la lignée *Astral* par rapport à la lignée 238 ( $V_{pep} : 6 \pm 4$  nmol.h $^{-1}$ .embryon $^{-1}$ ). La vitesse plus faible de synthèse du PEPp à partir du PEPc dans les embryons de la lignée 238 par rapport à la lignée *Astral* pourrait être due à un flux de carbone plus faible en amont de  $V_{pep}$ . Or, les flux en amont ( $V_{glyco}$ ) et en aval ( $V_{pk}$ ) de  $V_{pep}$  sont plus importants respectivement de 53 et 90 nmol.h $^{-1}$ .embryon $^{-1}$  que ceux observés dans la lignée *Astral* (**Figure 68 et Figure 69**). Ce résultat montre donc que le transporteur du PEP du cytosol vers le plaste est altéré dans la lignée 238 par rapport à la lignée *Astral*. Or l'analyse transcriptomique effectuée dans les embryons de lin âgés de 24 JAF a mis en évidence la surexpression de 3 ESTs (genolin\_c18105 363 ; genolin\_c36604 273 ; genolin\_c41500 348) codant pour des transporteurs de sucres, dont un EST (genolin\_c18105 363) code pour un transporteur général de sucres qui pourrait permettre le transport du PEP du cytosol au plaste.

La synthèse du PEPP s'effectue également à partir de TPp, importé du cytosol. Pour la lignée *Astral* la vitesse de transport du TP en TPp ( $V_{tcp} : 47 \pm 2 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) et la vitesse de synthèse du PEPP à partir du TPp ( $V_{glycp} : 12 \pm 3 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) sont inférieures aux vitesses de synthèse de ces composés dans les embryons de lin 238 ( $V_{tcp} : 80 \pm 4 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ;  $V_{glycp} : 46 \pm 4 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ). Bien que l'importation de TP vers le plaste et que le flux de carbone assurant la conversion de TPp et PEPP ( $V_{glycp}$ ) est plus important dans la lignée 238, la compensation de ce flux pour la synthèse de PEPP par rapport à la perte de  $V_{pep}$  dans les embryons 238 n'est pas suffisante pour compenser ces pertes. Ces résultats montrent donc l'importance du transporteur  $V_{pep}$  pour la synthèse des acides gras dans les embryons de lin. Toutefois, la différence du flux de carbone pour la synthèse des acides gras dans les embryons de lin *Astral* ( $V_{fas1} : 54 \pm 3 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) et 238 ( $V_{fas1} : 49,7 \pm 0,5 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) est faible et d'autres facteurs limitant à la synthèse des acides gras pourrait expliquer la différence de teneurs dans les embryons des deux lignées sélectionnées.

#### 3.3.2.2.2. Cofacteurs pour la synthèse des acides gras.

La synthèse des acides gras nécessite des cofacteurs, l'ATP, le NADPH et le NADH (Schwender, 2008 ; Bates *et al.*, 2013). La demande de ces cofacteurs pour la synthèse des acides gras correspond au flux nécessaire à la synthèse des acides gras ( $V_{fas1}$  ; Alonso *et al.*, 2010).

##### ➤ Le NADPH.

Le NADPH est produit par les réactions de la voie oxydative des pentoses phosphates, par l'enzyme malique ou les réactions de la phase claire de la photosynthèse. Dans notre analyse des flux métaboliques dans les embryons de lin, la vitesse de synthèse du P5Pp à partir du H6Pp correspondant à la réaction de la voie oxydative des pentoses phosphates ( $V_{pp1}$ ) est supérieure dans les embryons de la lignée *Astral* ( $V_{pp1} : 34 \pm 8 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) que dans les embryons de la lignée 238 ( $V_{pp1} : 29 \pm 5 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ). Cette réaction génère deux moles de NADPH à partir d'une mole de H6Pp. La vitesse de synthèse du NADPH dans les embryons de la lignée *Astral* a été estimée à  $68 \text{ nmol NADPH.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$  et à  $57,2 \text{ nmol NADPH.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$  dans les embryons de la lignée 238. Cette vitesse de synthèse de ce NADPH étant supérieure à la demande en NADPH pour la synthèse des acides

gras dans les embryons de lin *Astral* et 238, on peut conclure que le NADPH n'est pas un facteur limitant à la synthèse des acides gras pour la lignée 238.

➤ Le NADH.

Dans les plastes des embryons des graines oléagineuses, le NADH est produit par les réactions de la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (Vglycp) et de la pyruvate déshydrogénase (Vpdhp). La vitesse réactionnelle de la glycéraldéhyde3-phosphate déshydrogénase est supérieure dans les embryons de la lignée 238 (Vglycp :  $46 \pm 4 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) que dans les embryons de la lignée *Astral* (Vglycp :  $12 \pm 3 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ). La vitesse réactionnelle de la pyruvate déshydrogénase est, par contre, supérieure dans les embryons de la lignée *Astral* (Vpdhp :  $51,4 \pm 0,1 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) par rapport aux embryons de la lignée 238 (Vpdhp :  $49,7 \pm 0,5 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ). Nos résultats indiquent donc que les vitesses de synthèse du NADH dans les plastes sont supérieures dans les embryons de la lignée 238 ( $95,6 \text{ nmol NADH.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) par rapport aux embryons de la lignée *Astral* ( $63,2 \text{ nmol NADH.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ). Ces vitesses de synthèses étant supérieures à la demande pour la synthèse *de novo* d'acides gras, la vitesse de synthèse de ce cofacteur ne semble pas limitant à la synthèse des acides gras pour la lignée 238. La synthèse des acides aminés dans les plastes nécessite également du NADH. La vitesse de synthèse plus importante de NADH dans les embryons de la lignée 238 pourrait ainsi permettre une synthèse plus importante d'acides aminés dans les plastes.

➤ L'ATP.

La synthèse des acides gras utilise également de l'ATP. Ce besoin en ATP pour cette synthèse a été évalué à  $51,4 \pm 0,1 \text{ nmol ATP.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$  pour les embryons de la lignée *Astral* et à  $49,7 \pm 0,5 \text{ nmol ATP.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$  pour les embryons de la lignée 238. Dans les plastes, la production d'ATP est réalisée par les réactions de la pyruvate kinase (Vpkp) et de la phosphoglycérate kinase (Vglycp). L'analyse des flux métaboliques dans les embryons de la lignée *Astral* a montré que la vitesse de synthèse de la pyruvate kinase est supérieure dans les embryons de la lignée *Astral* (Vpkp :  $52,1 \pm 0,1 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) par rapport aux embryons de la lignée 238 (Vpkp :  $50,3 \pm 0,5 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) alors que la vitesse de la phosphoglycérate kinase est supérieure dans les embryons de la lignée 238 (Vglycp :  $46 \pm 4 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ) par rapport aux embryons de la lignée *Astral* (Vglycp :  $12 \pm 3 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ).

La vitesse de synthèse de l'ATP par les réactions de la pyruvate kinase (Vpkp) et de la phosphoglycérate kinase (Vglycp) est donc supérieure dans les embryons de lin 238 (92,2 nmol ATP.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>) par rapport aux embryons de lin *Astral* (63,9 nmol ATP.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>). Ces vitesses de synthèse étant supérieures aux demandes estimées pour la synthèse des acides gras, l'ATP ne semble pas être un facteur limitant à la synthèse des acides gras dans les embryons de la lignée 238.

#### 3.3.2.2.3. Le rôle du glycérol-3-phosphate dans l'accumulation des triglycérides.

Les acides gras sont stockés à 90 % sous forme de triglycérides (TAGs) et sont composés de 3 acides gras estérifiés sur un squelette de glyceraldéhyde-3-phosphate (G3P). Ce glyceraldéhyde-3-phosphate est synthétisé à partir du dihydroxyacétone phosphate (DHAP) par la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) dans le cytosol. Le G3P a été identifié comme un facteur limitant de l'accumulation des huiles dans les graines oléagineuses (Vigeolas et Geigensberger, 2004 ; Vigeolas *et al.*, 2007). En effet, les travaux réalisés par Vigeolas *et al.* (2007) ont montré que la surexpression de la G3PDH assurant la synthèse de G3P à partir du DHAP permettait d'augmenter de 40 % la teneur en lipides dans les graines matures de colza.

La vitesse de synthèse du G3P par la G3PDH (Vfas2) dans les embryons de la lignée accumulant le moins d'huile (238) est 29 fois plus faible (Vfas2 : 2,0 ± 0,3 nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>) que dans les embryons de la lignée accumulant le plus d'huile (*Astral* = Vfas2 : 58,2 ± 3,4 nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>) (**Figure 68 et Figure 69**).

Ce DHAP provient du F6P (par la Fructose bisphosphate aldolase) issu du catabolisme des hexoses dans le cytosol par les réactions de la glycolyse cytosolique (Vg, Vhk1, Vgf, Vald). Or, les flux de carbone provenant de Vhk1, Vgf et de Vald sont statistiquement plus importants pour la lignée 238 (Vhk1 : 340,6±0,4 nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup> ; Vgf : 106±2 nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup> ; Vald : 106±2 nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>) que pour la lignée *Astral* (Vhk1 : 321,6±0 nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup> ; Vgf : 91,6±0,9 nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup> ; Vald : 91,6±0,9 nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>). Ces résultats montrent que la réaction permettant la conversion du DHAP en G3P (Vfas2) est limitant dans les embryons de lin 238. L'analyse transcriptomique effectuée dans les embryons de la lignée *Astral* et 238 à 24 JAF a montré qu'une EST (genolin\_c10324 594) codant pour la glyceraldéhyde-3-phosphate est surexprimé dans les embryons de la lignée

*Astral* par rapport aux embryons de la lignée 238 (**Résultats et Discussions-Chapitre 2 & 2.3.2.1**), ce qui semble indiquer que ce gène est joue un rôle important dans l'accumulation différentielle d'huile dans les embryons des deux lignées étudiées.

L'analyse des flux métaboliques dans les embryons de lin 238 a également montré que le flux de carbone non utilisé pour la synthèse de G3P et du PEPp engendre un flux de carbone plus important pour les réactions Vpk, Vpyr, Vpdh et les réactions du cycle de Krebs par rapport à celui observé dans les embryons de la lignée *Astral*. L'analyse des flux métaboliques dans les embryons de deux mutants d'*Arabidopsis thaliana* ayant un phénotype « huile » (mutant *wri1-1* ; At3g54320) et un double mutant At5g52920 et At3g22960 (deux isoformes de la pyruvate kinase plastidique de *pkpβ1 pkpα*;) indique une augmentation de l'activité du cycle de TCA par rapport aux témoins (Lonien et Schwender, 2009). Cette activité est particulièrement prononcée dans le mutant *wri1-1*. Or, ces mutants présentent des teneurs en protéines plus importantes (+ 10 % mutant *wri1-1* et + 5 % double mutant *pkpβ1 pkpα*) que celles des témoins. Les auteurs émettent l'hypothèse qu'une plus grande activité du cycle de Krebs permet des flux de synthèse plus importants pour les acides aminés dérivant de l'oxaloacétate (ASP, ILE, LYS, THR, méthionine), du cétoglutarate (GLU, PRO, Arginine) et de la pyruvate (alanine).

L'absence de données pour les acides aminés dérivant de l'oxaloacétate (ASP, ILE, LYS, méthionine) ne permet pas à notre modèle mathématique de déterminer les flux métaboliques pour les réactions Vaspeff, Vileeff, Vlyseff malgré les contraintes imposées. Toutefois, l'analyse biochimique effectuée dans les embryons des lin *Astral* et 238 a montré une accumulation significative, plus importante de méthionine dans les embryons de la lignée 238 par rapport à la lignée *Astral* (**Résultats et Discussions-Chapitre 1, & 1.4.5**). Nos données de flux indiquent une vitesse de synthèse plus importante d'acide glutamique dans les embryons de la lignée 238 (Vglueff :  $1,2 \pm 0,1 \text{ nmol.h}^{-1} \cdot \text{embryon}^{-1}$ ) que dans les embryons de la lignée *Astral* (Vglueff :  $0,9 \pm 0,2 \text{ nmol.h}^{-1} \cdot \text{embryon}^{-1}$ ) en accord avec nos données biochimiques où une accumulation significative, plus importante d'acide glutamique a été observée dans les embryons de la lignée 238 par rapport aux embryons de la lignée *Astral* (**Résultats et Discussions-Chapitre1, & 1.4.5**).

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de nos recherches a été de comprendre les mécanismes impliqués dans les synthèses et l'accumulation des lipides dans les graines de lin. Ces mécanismes sont largement méconnus pour le lin. Dans les graines d'autres plantes oléagineuses (*Arabidopsis thaliana*, colza, tournesol), les facteurs génétiques, physiologiques, enzymatiques ont été identifiés pour réguler les teneurs en lipides. Ces différents facteurs sont souvent accompagnés par des changements métaboliques importants entraînant des accumulations différentielles de composés dans les graines de ces plantes. L'objectif de ce travail a été d'étudier par des analyses biochimiques, transcriptomiques puis fluxomiques, les mécanismes de synthèse et de régulation des teneurs en huiles dans des graines de lin. Pour cela, deux lignées de lin avec des teneurs en huile différentes ont été sélectionnées, la lignée *Astral* accumulant  $44,6 \pm 0,2$  g d'huile/100g MS et la lignée *238* accumulant  $37,0 \pm 0,7$  g d'huile/100g MS.

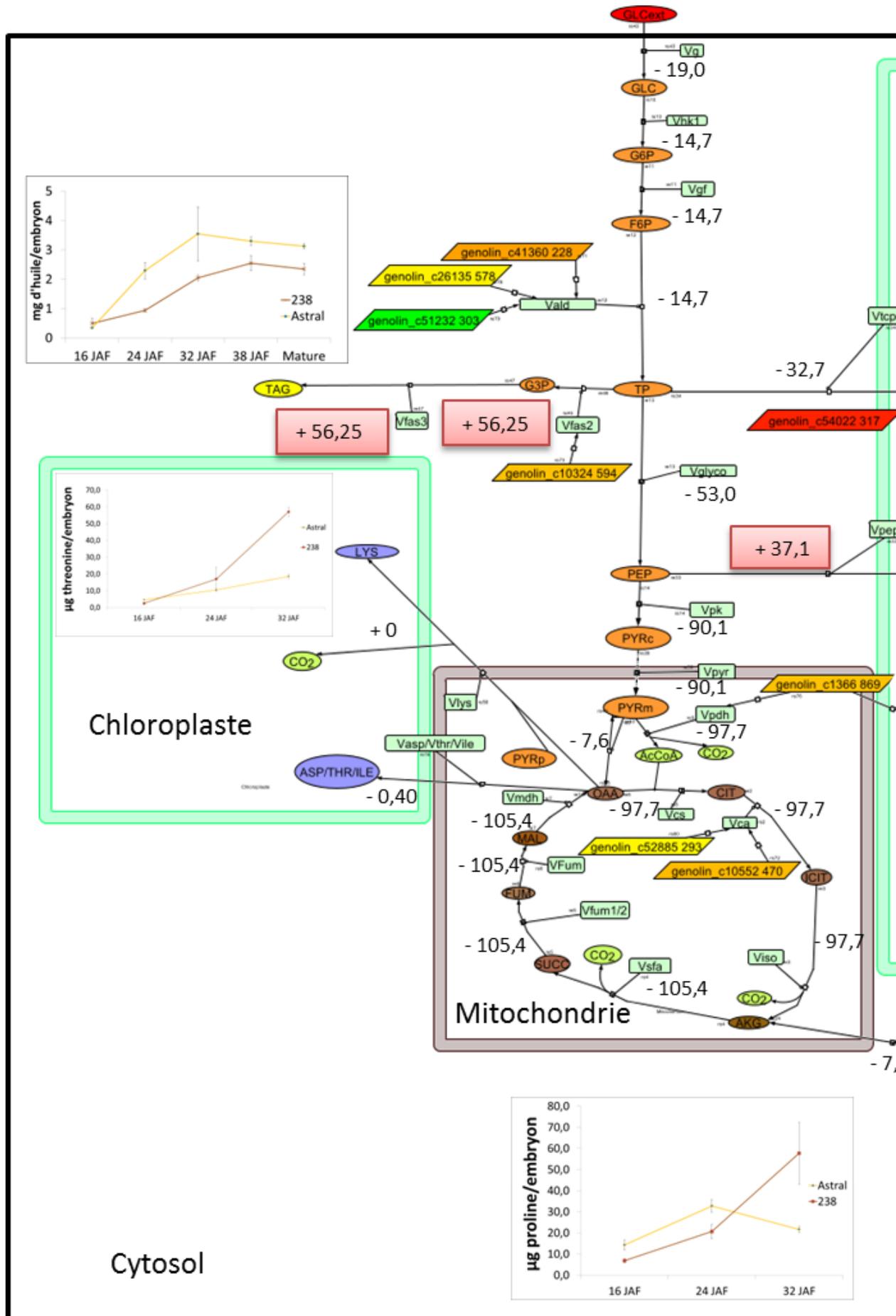
Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer les mécanismes de synthèse et d'accumulation dans les graines de lin *Astral*. Nos analyses biochimiques ont montré que les synthèses et les accumulations des huiles s'effectuent exclusivement dans les embryons de lin entre 16 et 32 JAF. Pour connaître les réseaux métaboliques et les précurseurs conduisant à la synthèse de ces huiles, nous avons incubé les embryons de lin âgés de 16 JAF dans un milieu de culture contenant soit du glucose marqué au carbone 13 [ $1-^{13}C_1$ -glucose] ou de la glutamine marqué au carbone 13 [ $U-^{13}C_5$ -glutamine]. Nous avons déterminé que, seul, le glucose participe à la synthèse des acides gras et que l'enzyme malique est inactive dans les graines de lin contrairement au maïs (Alonso *et al.*, 2010), au colza (Schwender *et al.*, 2003) et à *Arabidopsis thaliana* (Lonien et Schwender, 2009). Nous avons également déterminé une néoglucogénèse dans les embryons de lin qui pourrait provenir de l'activité d'enzymes telles que la glucose 6 phosphatase, la fructose 1,6 bisphosphatase et la pyruvate carboxylase ou encore la pyruvate phosphatase dikinase. Des analyses complémentaires seront réalisées pour prouver la présence de ces enzymes.

L'analyse des flux métaboliques dans les embryons de lin *Astral* a montré que le précurseur pour la synthèse des acides gras est le PYRp provenant du PEPP. Ce PEPP provient majoritairement du PEPc qui est synthétisé à partir du glucose par les réactions de la glycolyse cytosolique. Les réactions de la voie des pentoses phosphates semblent

suffisantes à la synthèse du NADPH nécessaire à la synthèse des acides gras. En comparaison avec les données de la littérature, le lin semble être un modèle original pour la synthèse des acides gras. Le réseau métabolique impliqué dans cette synthèse d'acides gras est similaire à celui observé dans des embryons photosynthétiques de colza (Schwender *et al.*, 2003) et d'*Arabidopsis thaliana* (Lonien et Schwender, 2009). Par contre, il présente certaines différences puisque pour les embryons de colza, tournesol et *Arabidopsis*, une partie du PYRp est synthétisée à partir du malate par l'enzyme malique. La synthèse de NADPH par les réactions des pentoses phosphates ne semble pas suffisante à la synthèse des acides gras dans ces embryons de colza et d'*Arabidopsis thaliana* contrairement au lin.

Le modèle lin est très différent de ceux des embryons non photosynthétiques. En effet, dans le modèle du maïs, le précurseur de la synthèse des acides gras, le PYRp provient en partie du PEPp puis est synthétisé à partir du G6Pp et en partie du malate synthétisé à partir de la glutamine (Alonso *et al.*, 2010). Dans ces embryons, les auteurs mentionnent que les réactions de la voie des pentoses phosphates sont suffisantes pour la synthèse du NADPH pour la synthèse des acides gras.

Dans un second temps, nous avons voulu déterminer les mécanismes régulant la synthèse et l'accumulation des huiles dans les graines de lin. Pour cela, nous avons comparé les flux métaboliques, le transcriptome et les données biochimiques de la lignée *Astral* à la lignée 238 qui accumule moins d'huile qu'*Astral* mais qui présente un profil en acide gras semblable. Cette étude a permis de mettre en évidence une synthèse moins importante de protéines dans les embryons de la lignée *Astral* par rapport à celle observée dans les embryons de la lignée 238. L'analyse de la composition de ces protéines a montré une accumulation significative plus importante d'histidine, d'acide glutamique, d'arginine et de méthionine dans les embryons de la lignée 238 que dans les embryons de la lignée *Astral* entre 16 et 32 JAF. Ces résultats montrent une éventuelle redirection du flux de carbone vers la synthèse de ces composés au détriment de la synthèse des acides gras dans les embryons (**Figure 69**).





### **Figure 69 : Différence d'expression des gènes, des flux métaboliques et des analyses biochimiques dans les embryons de lin *Astral* par rapport aux embryons de lin 238.**

Les métabolites sont représentés sous forme ovale orange (intermédiaires de la glycolyse), ovale jaune (acétyl-CoA plastidial, triglycéride, acides gras), ovale rose (métabolites de la voie des pentoses phosphates), ovale marron (métabolites de cycle de Krebs), ovale bleu (acides aminés), ovale rouge (métabolites entrant dans les embryons). Les réactions sont représentées par des réactions rectangles en vert clair. Les ESTs différentiellement exprimés apparaissent dans des rectangles avec le préfixe «genolin».

Niveau transcriptomique : Les rectangles correspondant aux ESTs sur-exprimés dans les embryons de 238 par rapport à ceux d'*Astral* sont de couleur verte. Les ESTs surexprimés (Log2ratio : [2 ;2,5]) dans les embryons *Astral* par rapport à 238 sont représentés par des rectangles de couleur jaune. Les ESTs surexprimés (Log2ratio : [2,5 ;3]) dans les embryons et téguments de *Astral* par rapport à 238 sont représentés par des rectangles de couleur jaune-orange. Les ESTs surexprimés (Log2 ≥3) dans les embryons *Astral* par rapport à 238 sont représentés par des rectangles de couleur en rouge.

Niveau fluxomique : La différence de flux *Astral* / 238 a été représenté sur la carte. L'unité est en nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup>.

Abréviations : **Métabolites** : GLNext : glutamine externe ; GLN : glutamine ; GLU : glutamate ; PRO : proline ; AKG : cétooglutarate ; SUCC : succinate ; FUM : fumarate ; MAL : malate ; OAA : oxaloacétate ; ICIT : isocitrate ; CIT : citrate ; AcCoA : acétyl-CoA ; PYRm : pyruvate mitochondriale ; ASP : aspartate ; THR : thréonine ; ILE : isoleucine ; LYS : lysine ; PYRc : pyruvate cytosolique ; PEP : phosphoenolpyruvate cytosolique ; TP : triose phosphate ; G3P : glyceraldéhyde-3-phosphate ; F6P : fructose-6-phosphate ; G6P : glucose-6-phosphate ; WALL : composés pariétaux ; GLC ext : glucose externe ; GLC : glucose ; STA : amidon ; H6Pp : hexose phosphate plastidial ; TPp : triose phosphate plastidial ; PEPp : phosphoenolpyruvate plastidial ; PYRp : pyruvate plastidial ; AcCoAp : acétyl-CoA plastidial ; ARO : intermédiaires aromatiques ; TYR : tyrosine ; PHE : phénylalanine ; ALA : alanine ; LEU1 : intermédiaire de la voie de biosynthèse de la leucine ; LEU : leucine ; VAL : valine ; GLY : glycine ; SER : sérine ; HIS : histidine ; P5Pp : ribose-5-phosphate ; S7Pp : sedoheptulose 7-phosphate ; E4Pp : érythrose-4-phosphate plastidial ; CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone ; Les métabolites comportant le suffixe eff sont les métabolites dosés. **Enzymes** : Vg : import de glucose ; Vhk1 : hexokinase ; Vgf : phosphoglucose isomérase ; Vald : aldolase ; Vglyco : phosphoglycérate ; Vpep : énoïase ; Vpk : pyruvate kinase ; Vpyp : transport de pyruvate ; Vpdh : pyruvate déshydrogénase ; Vcs : citrate synthase ; Vca : aconitase ; Viso : Isocitrate déshydrogénase ; Vsfa : cétooglutarate déshydrogénase ; Vfum1/2 : succinate déshydrogénase ; Vfum : fumarase ; Vmdh : malate déshydrogénase ; Vme : pyruvate carboxylase ; Vasp : aspartate transaminase ; Vaspeff : asparagine synthétase ; Vthr : homosérine kinase ; Vthreff : thréonine synthase ; Vile : dihydroxyacide déshydratase ; Vileeff : acide aminé aminotransférase ; Vlys : dihydrodipicolinate synthase/réductase ; Vlyseff : diaminopimelate décarboxylase ; Vakg : glutamate déshydrogénase ; Vglueff : glutamate synthase ; Vgl : glutamate synthase ; Vpro : glutamyl kinase ; Vproeff : pyrroline-5-carboxylase réductase ; Va : entrée de glutamine ; Vfas2 (a/b) : glycérol 3-phosphate déshydrogénase ; Vtcp : transporteur de triose phosphate entre le cytosol au chloroplaste ; Vpep : transporteur de pep du cytosol vers le chloroplaste ; Vstsp/Vsta : enzyme branchante ; Valdp : aldolase plastidiale ; Vglycp : phosphoglycérate plastidiale ; Vpkp : Pyruvate kinase plastidiale ; Vpdhp : pyruvate déshydrogénase plastidiale ; Vfas1 : acétyl-CoA carboxylase plastidiale ; Vval /Vvaleff : synthèse valine ; Vala/alaeff : alanine-ketoisovalérate aminotransférase ; Vleu1 : isopropylmalate synthase/isomérase/déshydrogénase ; Vleu : isopropylmalate déshydrogénase ; Vleueff : amino acide aminotransférase ; Vser : phosphosérine aminotransférase ; Vsereff : phosphosérine phosphatase ; Vgly/Vglyeff : glycine hydroxyméthyltransférase ; Varo : chorismate synthase ; Vphe : chorismate mutase ; Vpheeff : préphenate déshydratase ; Vtyreff : préphenate déshydrogénase ; Vpp1 : gluconate déshydrogénase ; Vpp2 : transcétolase ; Vpp3 : transaldolase ; Vpp4 : DAHP synthase ; Vhis : ribose phosphate pyrophosphokinase ; Vhiseff : histidinal déshydrogénase.

Pour mieux comprendre l'ensemble des résultats obtenus, une analyse transcriptomique a été effectuée avec les embryons des deux lignées de lin à 16, 24, 32, 38 JAF. De cette analyse, nous avons pu mettre en évidence une surexpression de gènes codant pour des enzymes du métabolisme carboné et notamment la DHAP synthase (genolin\_c54022 317) et la G3PDH (genolin\_c10324 594) dans les embryons de la lignée *Astral/238*. La comparaison des flux métaboliques dans les embryons de la lignée *Astral* par rapport à la lignée 238 (**Figure 69**) a montré que la vitesse de synthèse du G3P par la G3PDH est plus importante dans les embryons de lin *Astral* que dans les embryons de lin 238. Le pool de G3P est très important pour la synthèse des triglycérides puisqu'il est nécessaire à l'assemblage des TAGs (Vigeolas et Geisgensberger, 2004). Une étude de Vigeolas *et al.* en 2007 a montré que la surexpression de la G3PDH permettait une augmentation de 40 % de la teneur en huile dans les graines de colza.

La surexpression plus importante des gènes codant pour la pyruvate déshydrogénase (genolin\_c1366 869) et la sous unités béta de l'acétyl-CoA carboxylase (genolin\_c56523 320) pourrait permettre une meilleure conversion du pyruvate en acétyl-CoA puis en acides gras dans les embryons de la lignée *Astral/238* (**Figure 69**). Les données de la littérature ont montré que le facteur de transcription *WRINKLED1*, connu comme étant un régulateur important des teneurs en huile dans les graines, contrôle l'expression de ces gènes et du gène de la G3PDH dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* (Baud *et al.*, 2007b) et chez le maïs (Pouvreau *et al.*, 2011). Toutefois et dans notre étude, aucune différence significative n'a pu être notée dans l'expression des facteurs de transcription connus et contrôlant l'expression de gènes clés régulant les teneurs en huile (**Tableau XX – Chapitre 2 – Résultats et Discussions**). Des investigations plus poussées doivent être pris en compte car : (i) : seul un EST (genolin\_c18069 440) codant pour la protéine wrinkled est annoté, (ii) : le gène LEC1 (genolin\_c48032 197) contrôlant l'expression de *WRINKLED1* (Santos-Mendoza *et al.*, 2008) est surexprimé dans les embryons de la lignée *Astral/238* à 16 JAF (log2ratio : 1,32).

La comparaison des flux métaboliques entre les deux lignées de lin a également montré que la lignée 238 présente une activité au niveau du cycle de Krebs plus importante que la lignée *Astral*. Nos résultats seraient en accord avec les résultats énoncés par Lonien et Schwender en 2009 sur le mutant *wrinkled1* et un double mutant pour la pyruvate kinase. Ces deux mutants présentent moins d'huile et plus de protéines que leurs témoins. Cette activité plus importante au niveau du cycle de Krebs pourrait indiquer une synthèse plus

importante d'acides aminés dérivant des acides organiques. Dans nos travaux, nous avons mis en évidence une accumulation plus importante d'arginine, de méthionine et d'acide glutamique (acides aminés dérivant du cétooglutarate ou de l'oxaloacétate) dans les embryons de la lignée 238/*Astral* (**Figure 51 – Chapitre 1 – Résultats et Discussions**). Ces résultats sembleraient indiquer une redirection du flux de carbone vers la synthèse de ces composés au détriment de la synthèse du G3P dans les embryons de la lignée 238/*Astral*.

Nous avons pu également montré des différences d'accumulation dans les téguments des deux lignées de lin. La lignée *Astral* produisant le plus d'huile dans ses embryons présente des teneurs plus faibles en polyphénols, en proanthocyanidines, en protéines et en amidon ainsi que des teneurs plus élevées en mucilage que dans les téguments de la lignée *Astral*.

Afin de comprendre ces différences de production, nous avons regardé l'expression des gènes codant pour des enzymes intervenant dans les voies de biosynthèse des parois cellulaires, des proanthocyanidines, du métabolisme carboné et des facteurs de transcription pour les téguments des deux lignées. De cette étude, une surexpression de gènes codant pour la synthèse et la modification des parois végétales (glycosyltransférase : genolin\_c26492 285 ; cellulose synthase : genolin\_c1510 778 ; genolin\_c31895 293 ; genolin\_c18432 413) et de gènes codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse des proanthocyanidines (dihydroflavonol réductase : genolin\_c59534 291 ; flavanone 3 hydroxylase : genolin\_c42771 268) a pu être notée (**Tableau XIV – Chapitre 2 – Résultats et Discussions**). Ces surexpressions pourraient être à l'origine de l'accumulation différente de ces composés observée dans les deux lignées testées et expliquer le poids plus important des téguments obtenu dans la lignée 238 par rapport aux téguments de la lignée *Astral*.

Des travaux récents ont montré que des gènes exprimés dans les téguments de la graine d'*Arabidopsis thaliana* agissent à la fois sur la voie de biosynthèse des triglycérides et sur celle du mucilage (Shi *et al.*, 2012). Toutefois nous n'avons pas pu établir un lien entre les accumulations différentielles de ces composés dans les téguments et les embryons. Pour mieux appréhender les interactions se produisant entre le tégument et l'embryon de la graine, une approche pluridisciplinaire (transcriptomique, métabolomique, cytologique) devra être développée. Ces travaux seront menés en collaboration avec les équipes

impliquées dans l'étude des parois végétales et réalisés dans le cadre de la thèse de Fabien Miart (UPJV, PIVERT) (Miart *et al.*, 2013 ; Miart *et al.*, 2014a ; Miart *et al.*, 2014b).

Durant ces 3 années de thèse, nous avons également travaillé sur une lignée de lin qui accumule autant d'huile dans ses graines qu'*Astral*, mais qui présente un profil inhabituel en acides gras pour une graine de lin. En effet, cette lignée (198) synthétise très peu d'acide linoléique (198 : 1% ; *Astral* : 62,9 %) mais présente des teneurs en acide linoléique très élevées par rapport à *Astral* (*Astral* : 12,2 % ; 198 : 74,1 %). Les teneurs de l'acide palmitique, acide stéarique et l'acide oléique sont similaires. Pour comprendre pourquoi la lignée *Astral* accumule plus d'acide linoléique que la lignée 198, nous avons réalisé des analyses biochimiques, transcriptomiques et fluxomiques selon les protocoles décrits dans cette thèse et pour cette troisième lignée sélectionnée. Ces travaux n'ont pas été présentés dans le manuscrit de cette thèse. Cependant, nos résultats ont montré une surexpression de 3 ESTs codant pour la FAD3 désaturase A dans les embryons de lin *Astral/198* (genolin\_c44132 311, log2ratio : 2,74 ; genolin\_c58740 31, log2ratio : 2,62 ; genolin\_c58747 320 : 3,04) et de 3 ESTs codant pour la FAD3 désaturase B (genolin\_c55544 376, log2ratio : 3,87 ; genolin\_c58797 204, log2ratio 2,93 ; genolin\_c681 1641, log2ratio : 1,86) dans les embryons de la lignée *Astral/238*. La FAD3 désaturase est une enzyme qui permet la conversion de l'acide linoléique en acide linoléique. Or, dans les embryons de la lignée 198, les teneurs en acide linoléique (1%) sont faibles alors que les teneurs en acide linoléique sont très importantes (74 %) indiquant le non-fonctionnement de cette dernière étape de désaturation. Toutefois notre analyse n'a pas permis de trouver un facteur de transcription permettant de contrôler l'expression de ces FAD3. L'analyse biochimique et fluxomique n'a pas montré de différence majeure concernant l'accumulation d'huile par rapport à la lignée *Astral*. Cette lignée nous servira à valider le modèle mathématique "huile" mais aussi nous offre la possibilité de regarder la potentialité du modèle conçu dans ce travail pour identifier des modifications plus ponctuelles (plus fines) du métabolisme de ces plantes oléagineuses.

Les perspectives de ce travail à court terme consistent, d'une part, à confirmer la différence d'expression des gènes candidats par PCR quantitative, à définir les enrichissements isotopiques des acides aminés dans le modèle établi sur SYSTMETAB dans le but d'obtenir des flux déterminés pour les synthèses de ces composés. Des analyses des

enrichissements par RMN des sucres libres, acides organiques libres, acides aminés pourraient être réalisés de manière à mieux déterminer le modèle utilisé.

Durant cette thèse, des mesures à l'état non stationnaire ont été effectuées et seront utilisées pour établir des modèles en s'affranchissant des contraintes stationnaires. Ces travaux permettraient l'acquisition de données expérimentales plus rapidement avec des embryons tout en s'affranchissant des problèmes liés spécifiquement à la culture des embryons.

A long terme, le modèle établi servira aussi à l'étude des plantes de lin transgéniques et le développement de modèles prédictifs pour aider le scientifique à une démarche décisionnaire sur le choix de constructions pour améliorer les plantes de lin. L'interaction tégument/embryon est également une question à considérer puisque de récentes études ont montré des interactions régulant les teneurs en huiles (Shi *et al.*, 2012). Ces données permettront une sélection par marqueur assisté plus efficace pour développer des graines de lin accumulant plus d'huile.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Acket S., Blondiaux M., Bouton S., Pageau K., Pau-Roblot C., Lequart M., Marcelo P., Fournet F., Van Wuytswinkel O.** (2011). Formation et structure du mucilage séminal chez le lin, Poster Réseaux Français des Parois (6-8 juin), Lille.

**Allman-Farinelli M. A., Hall D., Kingham K., Pang D., Petocz P., Favaloro E. J.** (1999). Comparison of the effects of two low fat diets with different  $\alpha$ -linolenic:linoleic acid ratios on coagulation and fibrinolysis. *Atherosclerosis*. 142, 159-168.

**Allen D. K., Ohlrogge J. B., Shachar-Hill Y.** (2009). The role of light in soybean seed filling metabolism. *Plant J.* 58, 220–234.

**Alonso A. P., Dale V. L., Shachar-Hill Y.** (2010). Understanding fatty acid synthesis in developing maize embryos using metabolic flux analysis. *Metab. Eng.* 12, 488–497.

**Alonso A. P., Goffman F. D., Ohlrogge J. B., Shachar-Hill Y.** (2007). Carbon conversion efficiency and central metabolic fluxes in developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) embryos. *Plant J.* 52, 296–308.

**Alonso A. P., Vigeolas H., Raymond P., Rolin D., Dieuaide-Noubhani M.** (2005). A new substrate cycle in plants. Evidence for a high glucose-phosphate-to-glucose turnover from in vivo steady-state and pulse-labeling experiments with [13C]glucose and [14C]glucose. *Plant Physiol.* 138, 2220–2232.

**Alonso, R., Onate-Sanchez, L., Weltmeier, F., Ehlert, A., Diaz, I., Dietrich, K., Vicente-Carbajosa, J., and Droge-Laser, W.** (2009). A pivotal role of the basic leucine zipper transcription factor bZIP53 in the regulation of Arabidopsis seed maturation gene expression based on heterodimerization and protein complex formation. *Plant Cell.* 21, 1747–1761.

**Alix S., Marais S., Morvan C., Lebrun L.** (2008). Biocomposite materials from flax plants: Preparation and properties. *Composites Part A Applied Science and Manufacturing.* 39, 1793-1801.

**Alu'datt M. H., Rababah T., Ereifej K., Alli I.** (2013). Distribution, antioxidant and characterisation of phenolic compounds in soybeans, flaxseed and olives. *Food Chem.* 15, 93-99.

**Andre C., Froehlich J. E., Moll M. R., Benning C.** (2007). A heteromeric plastidic pyruvate kinase complex involved in seed oil biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 19, 2006–2022.

**Angeles-Nuñez J.G., Tiessen A.** (2011). Regulation of Arabidopsis SUS2 and SUS3 by glucose and the transcription factor LEC2 in different tissues and at different stages of seed development. *Plant Mol. Biol.* 78, 377-392.

**ANSES** (2011) Rapport d'expertise collective : actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail. pp. 327.

**Arrêté du 12 juillet 2010** modifiant l'arrêté du 4 décembre 2008 fixant les conditions d'utilisation de l'huile de lin pour un usage alimentaire. Dans " JORF n°0166 du 21 juillet 2010, texte n°37, pp. 13441.

**Arsovski A. A., Haughn W. G., Western L. T.** (2010). Seed coat mucilage cells of *Arabidopsis thaliana* as a model for plant cell wall research. *Plant signaling & Behavior*. 5, 1-6.

**Attoumbré J., Bienaimé C., Dubois F., Fliniaux M. A., Chabbert B., Baltora-Rosset S.** (2010). Development of antibodies against secoisolariciresinol-application to the immunolocalisation of lignans in *Linum usitatissimum* seeds. *Phytochemistry*. 71, 1979-1987.

**Bagheri Z.S., El Sawi I., Schemitsch E.H., Zdero R., Bougherara H.** (2013). Biomechanical properties of an advanced new carbon/flax/epoxy composite material for bone plate applications. *J. Mech.Behav. Biomed. Mater.* 20, 398-406.

**Banik M., Duguid S., Cloutier S.** (2011). Transcript profiling and gene characterization of three fatty acid desaturase genes in high, moderate and low linolenic acid genotypes of flax (*Linum usitatissimum* L.) and their role in linolenic acid accumulation. *Genome*. 54, 471–483.

**Bates P., Fatihi A., Snapp A.R., Carlsson A.S., Browse J., Lu C.** (2012). Acyl editing and headgroup exchange are the major mechanisms that direct polyunsaturated fatty acid flux into triacylglycerols. *Plant Physiol*. **160**, 1530–1539.

**Bates P., Stymne S., Ohlrogge J.** (2013). Biochemical pathways in seed oil synthesis. *Curr Opin. Plant Biol*. 16, 358–364.

**Baud S., Boutin J.P., Miquel M., Lepiniec L., Rochat C.** (2002). An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiol Biochem*. 40, 151-160.

**Baud S., Lepiniec L.** (2010) Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Prog Lipid Res*. 49, 235-249.

**Baud S., Mendoza M. S., To A., Harscoët E, Lepiniec L., Dubreucq B.** (2007a). WRINKLED1 specifies the regulatory action of LEAFY COTYLEDON2 towards fatty acid metabolism during seed maturation in *Arabidopsis*. *Plant J*. 50, 825-838.

**Baud S., Wuillème S., Dubreucq B., de Almeida A., Vuagnat C., Lepiniec L., Miquel M., Rochat C.** (2007b). Function of plastidial pyruvate kinases in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 52, 405-419.

**Baud S., Wuillème S., Lemoine R., Kronenberger J., Caboche M., Lepiniec L., Miquel M., Rochat C.** (2005). The AtSUC5 sucrose transporter specifically expressed in the endosperm is involved in early seed development in *Arabidopsis*. *Plant J*. 43, 824-836.

**Barvkar V.T., Pardeshi V.C., Kale S.M., Kadoo N.Y., Giri A.P., Gupta V.S.** (2012). Proteome profiling of flax (*Linum usitatissimum*) seed: characterization of functional metabolic pathways operating during seed development. *J. Proteome Res*. 11, 6264-7626.

**Basch E., Mphil D., Bent S., Collins J., Dacey C., Hammerness P., Harrison M., Smith M., Szapary P., Ulbricht C., Vora M., Weissner W.** (2007). Flax and flaxseed oil (*Linum usitatissimum*): a review by the Natural Standard Research Collaboration. *J. Soc. Int. Onc.* 5, 92-105.

**Beard. B. H., Comstock V.E.** (1980). Flax. Hybridization of Crop Plants. *American Society of Agronomy-Crop Science Society of America.* 357-366.

**Berg J., Tymoczko J., Stryer L.** (2013). Biochimie (7ième Edition). Editions Lavoisier. Chapitre 24 : Biosynthèse des aminoacides. 705-730.

**Bernhardt C., Zhao M., Gonzalez A., Lloyd A., Schiefelbein J.** (2005). The bHLH genes *GL3* and *EGL3* participate in an intercellular regulatory circuit that controls cell patterning in the Arabidopsis root epidermis. *Development.* 132, 291–298.

**Bligh E. G., et Dyer W. J.** (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology.* 37, 911–917.

**Bolstad B.M., Irizarry R.A., Astrand M., Speed T.P.** (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics.* 19(2):185-193.

**Bomal C., Bedon F., Caron S., Mansfield S.D., Levasseur C., Cooke J.E.** (2008). Involvement of *Pinus taeda* MYB1 and MYB8 in phenylpropanoid metabolism and secondary cell wall biogenesis: a comparative in planta analysis. *J. Exp. Bot.* 59, 3925-3939.

**Borisjuk L., Nguyen T.H., Neuberger T., Rutten T., Tschiersch H., Claus B., Feussner I., Webb A.G., Jakob P., Weber H., Wobus U., Rolletschek H.** (2005). Gradients of lipid storage, photosynthesis and plastid differentiation in developing soybean seeds, *New Phytol.* vol. 167, 761–776.

**Boussetta N.** (2010). Intensification de l'extraction des polyphénols par électrotechnologies pour la valorisation des marcs de Champagne. Thèse de doctorat, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France, pp 255.

**Bouvier-Navé P., Benveniste P., Oelkers P., Sturley S. L., Schaller H.** (2000). Expression in yeast and tobacco of plant cDNAs encoding acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase. *Eur. J. Biochem.* 267, 85–96.

**Bradford M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72, 248–254.

**Braybrook S. A., Stone S. L., Park S., Bui A. Q., Le B.H., Fischer R. L., Goldberg R. B., Harada J.J.** (2006). Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci.* 103, 3468-3473.

- Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L.** (2000). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *American Society of Plant Physiologists*, Rockville, Maryland, 1367 pp.
- Burton R.A., Gibeaut D.M., Bacic A., Findlay K., Roberts K., Hamilton A., Baulcombe D. C., Fincher G. B.** (2000). Virus-induced gene silencing of a plant cellulose synthase gene. *Plant Cell*. 12, 691–706.
- Caffall K.H., Mohnen D.** (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr Res.* 344, 1879–1900.
- Cardoso carraro J. C., Inês de souza dantas M., Rocha espeschit A. C., Duarte martino H. S., Rocha ribeiro S. M.** (2012). Flaxseed and Human Health: Reviewing Benefits and Adverse Effects. *Food Rev. Int.* 28, 203-230.
- Catalano L., Franco I., De Nobili M., Leita L.** (1999). Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents : a comparaison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods. *Agrochimica.* 43, 193-205.
- Cernac A., Benning C.** (2004). WRINKLED1 encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J.* 40, 575–585.
- Cheng W. H., Taliercio E.W., Chourey P.S.** (1996). The *Miniature1* seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel. *Plant Cell.* 8 : 971-983.
- Chung M., Lei B., Li-Chang E.** (2005). Isolation and structural characterization of the major protein fraction from NorMan flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Food Chem.* 90, 271-279.
- Combo A. M. M., Aguedo M., Paquot M.** (2011). Les oligosaccharides pectiques : production et applications possibles. *Biotechnol. Agron. Soc. Envir.* 15, 153-164.
- Coskuner Y., Karababa E.** (2007). Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *J.Food Eng.* 78, 1067-1073.
- Curaba J., Moritz T., Blervaque R., Parcy F., Raz V., Herzog M., Vachon G.** (2004). AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 136, 3660–3669.
- Czemplik M., Boba A., Kostyn K., Kulma A., Mituła A., Sztajnert M., Wróbel- Kwiatkowska M., Żuk M., Szopa J., Skórkowska-Telichowska K.** (2011). Flax Engineering for Biomedical Application. *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies.* Chap 17. 407-434.
- Davin L. B., Wang H. B., Crowell A. L., Bedgar D. L., Martin D. M., Sarkanen S., Lewis N. G.** (1997). Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science.* 275, 362-367.

- Daun J., Barthet V., Chornick T., Duguid S.** (2003). Structure, composition, and variety development of flaxseed. *Flaxseed in Human Nutrition, Second Edition*. Eds Thompson, L. U. and Cunnane, S. C., AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, pp 1-40.
- Dhakal H.N., Zhang Z.Y., Guthrie R., Macmullen J., Bennett N.** (2013). Development of flax/carbon fibre hybrid composites for enhanced properties. *Carbohydrate Polymers* 96, 1-8.
- Dieuaide-Noubhani M., Alonso AP., Roby C., Raymond P.** (2004). Mesures des flux métaboliques. La génomique en biologie végétale. INRA éditions.
- Dieuaide-Noubhani M., Raffard G., Canioni P., Pradet A., Raymond P.** (1995). Quantification of compartmented metabolic fluxes in maize root tips using isotope distribution from <sup>13</sup>C- or <sup>14</sup>C-labeled glucose. *J. Biol. Chem.* 270, 13147–13159.
- Di Matteo A., Giovane A., Raiola A., Camardella L., Bonivento D., De Lorenzo G., Cervone F., Bellincampi D., Tsernoglou D.** (2005). Structural basis for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein. *Plant Cell.* 17, 849–858.
- Dixit S., Kanakraj S., Rehman A.** (2012). Linseed oil as a potential resource for bio-diesel: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 16, 4415–4421.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F.** (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Durrett T., Benning C., Ohlrogge J.** (2008). Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *Plant J.* 54, 593-607.
- Dussert S., Guerin C., Andersson M., Joët T., Tranbarger T. J., Pizot M., Sarah G., Omoro A., Durand-Gasselín T., Morcillo F.** (2013). Comparative Transcriptome Analysis of Three Oil Palm Fruit and Seed Tissues That Differ in Oil Content and Fatty Acid Composition. *Plant Physiol.* 162, 1337–1358.
- Eastmond P. J., Germain V., Lange P. R., Bryce J. H., Smith S. M., Graham I. A.** (2000) Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 5669–5674
- Eulgem T.** (2006). Dissecting the WRKY web of plant defense regulators. *PLOS Pathogens.* 2, 1028-1030.
- Fait A., Angelovici R., Less H., Ohad I., Urbanczyk-Wochniak E., Fernie A.R., Galili G.** (2006). Arabidopsis seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiol.* 142, 839–854.

**Fang J., Ramsay A., Paetz C., Tatsis E. C., Renouard S., Hano C., Grand E., Fliniaux O., Roscher A., Mesnard F., Schneider B.** (2013). Concentration Kinetics of Secoisolariciresinol Diglucoside and its Biosynthetic Precursor Coniferin in Developing Flaxseed. *Phytochem. Anal.* 24, 41-46.

**Fatihi A., Zbierzak A. M., Dörmann P.** (2013). Alterations in Seed Development Gene Expression Affect Size and Oil Content of Arabidopsis Seeds. *Plant Physiol.* 163, 973–985.

**Fenart S., Chabi M., Gallina S., Huis R., Neutelings G., Rivière N., Thomasset B., Hawkins S., Lucau-Danila A.** (2013). Intra-platform comparison of 25-mers and 60-mers oligonucleotide Nimblegen DNA microarrays. *BMC Research Notes.* 6, 43-54.

**Fenart S., Ndong YPA., Duarte J., Rivière N., van Wuytswinkel O., Lucau A., Cariou E., Neutelings G., Gutierrez L., Chabbert B., Guillot X., Tavernier R., Hawkins S., Thomasset B.** (2010). Development and validation of a flax (*Linum usitatissimum* L.) gene expression oligo microarray. *BMC Genomics.* 11, 592-606.

**Fernald M. L.** (1950). Gray's Manual of Botany. Eight edition (Corrected Printing, R.C. Rollins, 1970). D. Van Nostrand Company, New York, NY. 1632 p.

**Fernie A.R., Roscher A., Ratcliffe R.G., Kruger N.J.** (2001). Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1- phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta.* 212, 250–263.

**Finkelstein R.R., Somerville C. R.** (1990). Three classes of abscisic acid (ABA)-insensitive mutations of Arabidopsis define genes that control overlapping subsets of ABA responses. *Plant Physiol.* 94, 1172-1179.

**FitzPatrick M., Cunningham M.P., Whitney R.A.** (2010). A biorefinery processing perspective : Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology.* 101, 8915-8922.

**Fliniaux O., Corbin C., Ramsay A., Renouard S., Beejmohun V., Doussot J., Falguières A., Ferroud C., Lamblin F., Lainé E., Roscher A., Grand E., Mesnard F., Hano C.** (2014). Microwave-Assisted Extraction of Herbacetin Diglucoside from Flax (*Linum usitatissimum* L.) Seed Cakes and Its Quantification using an RP-HPLC-UV System. *Molecules.* 19, 3025-3037.

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

**Fofana B., Cloutier S., Duguid S., Ching J., Rampitch C.** (2006). Gene expression of stearoyl-ACP desaturase and  $\Delta 12$  fatty acid desaturase 2 is modulated during seed development of flax (*Linum usitatissimum*). *Lipids.* 41, 705–712.

**Ford J. D., Huang K. S., Wang H. B., Davin L. B., Lewis N. G.** (2001). Biosynthetic pathway to the cancer chemopreventive secoisolariciresinol diglucoside–hydroxymethyl glutaryl ester-linked lignan oligomers in flax (*Linum usitatissimum*) seed. *J. Nat. Prod.* 64, 1388-1397.

- Foster C. E., Martin T. M., et Pauly M.** (2010). Comprehensive compositional analysis of plant cell walls (lignocellulosic biomass) part II: carbohydrates. *Journal of Visualized Experiments* : JoVE. doi:10.3791/1837
- Fowler Z. L., Leonard E., Koffas M.** (2008): Biosynthesis of Cellular Building Blocks: The Prerequisites of Life, in *The Metabolic Pathway Engineering Handbook Fundamental*, Ed by Christina Smolke, 82-94.
- Froment M.A., Smith J.M., Freeman K.** (1999) Influence of environmental and agronomical factors contributing to increased levels of phospholipides in oil from UK linseed *Linum usitatissimum*. *Ind. Crops Prod.* 10, 201-207.
- Funahashi A., Matsuoka Y., Jouraku A., Morohashi M., Kikuchi N., Kitano H.** (2008). CellDesigner 3.5: A Versatile Modeling Tool for Biochemical Networks. *Proceedings of the IEEE.* 96 : (8), 1254-1265.
- Funahashi A., Tanimura N., Morohashi M., Kitano H.** (2003). CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks. *BIOSILICO.* 1, 159-162.
- Gabiani C.P.** (2005). The response of linseed (*Linum usitatissimum* L.) to irrigation, nitrogen and plant population. PhD thesis Lincoln University.
- Gazzarrini S., Tsuchiya Y., Lumba S., Okamoto M., McCourt P.** (2004). The transcription factor *FUSCA3* controls developmental timing in *Arabidopsis* through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Dev Cell.* 7, 373–385.
- Gill K.S.** (1987). Linseed. *Indian Council of Agricultural Research.* New Delhi. 386 p.
- Goffman F.D., Alonso A.P., Schwender J., Shachar-Hill Y., Ohlrogge J.B.** (2005). Light enables a very high efficiency of carbon storage in developing embryos of rapeseed. *Plant Physiol.* 138, 2269–2279.
- Goicoechea M., Lacombe E., Legay S., Mihaljevic S., Rech P., Jauneau, A.** (2005). EgMYB2, a new transcriptional activator from Eucalyptus xylem, regulates secondary cell wall formation and lignin biosynthesis. *Plant J.* 43, 553-567.
- Gonzalez A., Mendenhall J., Huo Y., Lloyd A.** (2009). TTG1 complex MYBs, MYB5 and TT2, control outer seed coat differentiation. *Dev. Biol.* 325, 412–421.
- Guilloux K., Gaillard I., Courtois J., Courtois B., Petit E.** (2009). Production of Arabinoxylan-oligosaccharides from Flaxseed (*Linum usitatissimum*). *J. Agric. Food Chem.* 57, 11308-11313.
- Guo D., Chen F., Inoue K., Blount J.W., Dixon R.A.** (2001). Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *Plant Cell.* 13, 73-88.

**Gutiérrez C., Rubilar M., Jara C., Verdugo M., Sineiro J., Shene C.** (2010). Flaxseed and flaxseed cake as a source of compounds for food industry. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10, 454-463.

**Gutierrez L., Conejero G., Castelain M., Guénin S., Verdeil J-L., Thomasset B., Van Wuytswinkel O.** (2006). Identification of new gene expression regulators specifically expressed during plant seed maturation. *J. Exp. Bot.* 57, 1919-1932.

**Gutierrez L., Van Wuytswinkel O., Castelain M., Bellini C.** (2007). Combined networks regulating seed maturation. *Trends Plant Sci.* 12, 294-300.

**Harada J.J.** (2001). Role of Arabidopsis LEAFY COTYLEDON genes in seed development. *J Plant Physiol.* 158, 405–409.

**Hatzfeld W.D., Stitt M.** (1990). Study of the rate of recycling of triose phosphates in heterotrophic *Chenopodium rubrum* cells, potato tubers, and maize endosperm. *Planta.* 180, 198–204.

**Heisler M.G., Atkinson A., Bylstra Y.H., Walsh R., Smyth D.R.** (2001). SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in Arabidopsis, encodes a bHLH protein. *Development.* 128, 1089-1098.

**Hemmati S., Von Heimendahl C. B., Klaes M., Alfermann A. W., Schmidt T. J., Fuss E.** (2010). Pinoresinol-lariciresinol reductases with opposite enantio specificity determine the enantiomeric composition of lignans in the different organs of *Linum usitatissimum* L. *Planta Med.* 76, 928-934.

**Hu Z., Wang X., Zhan G., Liu G., Hua W., Wang H.** (2009). Unusually large oilbodies are highly correlated with lower oil content in *Brassica napus*. *Plant Cell Rep.* 28, 541–54.

**Hu C., Yuan V., Kitts D.** (2007). Antioxydant activities of the flaxseed lignin secosolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterediol and enterolactone in vitro. *Food Chem. Toxicol.* 45, 2219-2227.

**Huali Y.Z.W.** (2006). Effets de la densité de semis et de la disponibilité en eau sur le développement et l'élaboration du rendement du lin oléagineux d'hiver et de printemps. Engineer report project, IPLB, Beauvais.

**Ibrahim H., Farag M., Megahed H., Mehanny S.** (2014). Carracteristics of starch-based biodegradable composites reinforced with date palm and flax fibers. *Carbohydr Polym.* 101, 11-19.

**Idrissi Taghki A.** (2009) : Etude de type métabolisme intégré entre embryons de colza transgéniques ou non. Thèse de l'Université de Technologie de Compiègne, France.

- Irizarry R.A., Hobbs B., Collin F., Beazer-Barclay Y.D., Antonellis K.J., Scherf U., Speed T.P.** (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. **4**(2):249-264.
- Iyer V.V., G. Sriram, D.B. Fulton, R. Zhou, M.E. Westgate, J.V. Shanks.** (2008). Metabolic flux maps comparing the effect of temperature on protein and oil biosynthesis in developing soybean cotyledons. *Plant Cell Environ.* **31**, 506–517.
- Izydorczyk M.S., Dexter J.E.** (2008). Barley  $\beta$ -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products – a Review. *Food Res. Int.* **41**, 850-868.
- Jain R. K., Coffey M., Lai K., Kumar A., MacKenzie S. L.** (2000). Enhancement of seed oil content by expression of glycerol-3-phosphate acyltransferase genes. *Biochem Soc Trans.* **28**, 958–961.
- Jako C., Kumar A., Wei Y., Zou J., Barton D. L., Giblin E. M., Covello P. S., Taylor D. C.** (2001). Seed specific over-expression of an Arabidopsis cDNA encoding a diacylglycerol acyltransferase enhances seed oil content and seed weight. *Plant Physiol.* **126**, 861–874.
- Jhala J. A., Hall. M.L.** (2010) Flax (*Linum usitatissimum L.*) : Current Uses and Future Applications. *Australian J. Basic Appl. Sci.* **4**, 4304-4312.
- Kanehisa M.** (1997). A database for post-genome analysis. *Trend in Genetics.* **13**:(9), 375-376.
- Kang H.G., Park S., Matsuoka M., An G.** (2005). White-core endosperm floury endosperm-4 in rice is generated by knockout mutations in the C-type pyruvate orthophosphate dikinase gene (OsPPDKB). *The Plant Journal.* **42**, 901–911.
- Kasote D. M.** (2013). Flaxseed phenolics as natural antioxidants. *Int. Food Res. J.* **20**, 27-34.
- Katavic V., Reed D. W., Taylor D. C., Giblin E. M., Barton D. L., Zou J., MacKenzie S. L., Covello P. S., Kunst L.** (1995). Alteration of seed fatty acid composition by an ethyl methanesulfonate-induced mutation in *Arabidopsis thaliana* affecting diacylglycerol acyltransferase activity. *Plant Physiol.* **108**, 399-409.
- Keijsers E.R., Yilmaz G., van Dam J.E.** (2013). The celli-ulose resource matrix. *Carbohydr Polym.* **93**, 9-21.
- Kennedy E.P.** (1961). Biosynthesis of complex lipids. *Fed Proc Am Soc Exp Biol.* **20**, 934-940.
- Kim I., Zambrysky P.C.** (2005). Cell-to-cell communication via plasmodesmata during Arabidopsis embryogenesis. *Curr Opin Plant Biol.* **8**, 593-599.

**Kim M. J., Yang S. W., Mao H. Z., Veena S. P., Yin J. L., Chua N. H.** (2014) Gene silencing of Sugar-dependent 1 (JcSDP1), encoding a patatin-domain triacylglycerol lipase, enhances seed oil accumulation in *Jatropha curcas*. *Biotechnol Biofuels*. **7**:(36), 1-16.

**Kim S., Ma J., Perret P., Li Z., Thomas T.** (2002). Arabidopsis ABI5 subfamily members have distinct DNA binding and transcriptional activities. *Plant Physiol*. **130**, 688–697.

**Kitts D.D., Yuan Y.V., Wijewickreme A.N., Thompson L.U.** (1999). Antioxydant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterediol and enterolactone. *Mol. Cell. Biochem*. **202**, 91-100.

**Koubaa M.** (2012) : Etude comparative du métabolisme des lipides dans des embryons de plantes oléagineuses productrices d'acides gras inhabituelles ou non. Modélisation des systèmes. Thèse de l'Université de Technologie de Compiègne, France.

**Koubaa M., Cocuron J. C., Thomasset B., Alonso A. P.** (2013). Highlighting the tricarboxylic acid cycle: liquid and gas chromatography-mass spectrometry analyses of (13)C-labeled organic acids. *Anal Biochem*. **436**(2):151-159.

**Koubaa M., Mghaieth S., Thomasset B., Roscher A.** (2012). Gas chromatography–mass spectrometry analysis of 13C labeling in sugars for metabolic flux analysis, *Anal. Bioche*. **425**, 183–188.

**Koubaa M., Thomasset B., Roscher A.** (2014). Quantifying 13C-labeling in free sugars and starch by GC-MS. *Methods Molec. Biol*. **1090**, 121-130.

**Klubicová K., Danchenko M., Skultety L., Berezhna V.V., Rashydov N.M., Hajduch M.** (2013). Radioactive Chernobyl environment has produced high-oil flax seeds that show proteome alterations related to carbon metabolism during seed development. *J. Proteome Res*. **12**, 4799- 4806.

**Kwong R.W., Bui A.Q., Lee H., Kwong L.W., Fischer R.L., Goldberg RB., Harada J.J.** (2003). *LEAFYCOTYLEDON1-LIKE* defines a class of regulators essential for embryo development. *Plant Cell*. **15**, 5–18.

**Labalette F., Landé N., Wagner D., Roux-Duparque M., Saillet E.** (2011). La filière lin oléagineux française : panorama et perspectives. *OCL*. **18**, 113-122.

**Lafond G.P., Irvine B., Johnston A.M., May W.E., Mcandrew D.W., Shirliffe S.J., Stevenson F.C.** (2008). Impact of agronomic factors on seed yield formation and quality in flax. *Can. J. Plant Sci*. **88**, 485-500.

**Lainé E., Hano C., Lamblin F.** (2007). Les lignanes phytoestrogènes du lin sont-ils des bienfaiteurs méconnus ? *Phytothérapie*. **5**, 121-128.

- Lamblin F., Hano C., Fliniaux O., Mesnard F., Fliniaux M.A., Lainé E.** (2008). Interest of lignans in prevention and treatment of cancers. *Med Sci.* 24, 511-520.
- Lardizabal K. D., Effertz R., Levering C., Mai J., Pedroso M. C., Jury T.** (2008). Expression of *Umbelopsis ramanniana* DGAT2A in seed increases oil in soybean. *Plant Physiol.* 148, 89–96.
- Legay S., Sivadon P., Blervacq A-S, Pavy N., Baghdady A., Tremblay L., Levasseur C., Ladouce N., Lapiere C., Seguin A., Hawkin S., Mackay J., Grima-Pettenati J.** (2010). EgMYB1, an R2R3 MYB transcription factor from eucalyptus negatively regulates secondary cell wall formation in *Arabidopsis* and poplar. *New Phytologist.* 188, 774–786.
- Lepiniec L., Debeaujon I., Routaboul J. M., Baudry A., Pourcel L., Nesi N., Caboche M.** (2006). Genetics and Biochemistry of Seed Flavonoids. *Annu Rev Plant Biol.* 57, 405-430.
- Li S.F., Milliken O.N., Pham H., Seyit R., Napoli R., Preston J., Koltunow A.M., Parish R. W.** (2009). The *Arabidopsis* MYB5 transcription factor regulates mucilage synthesis, seed coat development, and trichome morphogenesis. *Plant Cell.* 21, 72–89.
- Li X., Chen W., Zhao Y., Xiang Y., Jiang H., Zhu S., Cheng B.** (2013). Downregulation of caffeoyl-CoA O-methyltransferase (*CCoAOMT*) by RNA interference leads to reduced lignin production in maize straw. *Genet Mol Biol.* 36, 540–546.
- Libourel G.L., Gehan J.P., Shachar-Hill Y.** (2007). Design of substrate label for steady state flux measurements in plant systems using the metabolic network of *Brassica napus* embryos. *Phytochemistry.* 68, 2211–2221.
- Liljegren S. J., Roeder A. H., Kempin S. A., Gremski K., Ostergaard L., Guimil S., Reyes D. K., Yanofsky M. F.** (2004). Control of fruit patterning in *Arabidopsis* by INDEHISCENT. *Cell.* 116, 843-853.
- Liu W.X., Hua H. L., Qing Q. L.** (2013). Embryo-specific expression of soybean oleosin altered oil body morphogenesis and increased lipid content in transgenic rice seeds. *Theor Appl Genet.* 126, 2289–2297.
- Liu J., Hua W., Zhan G., Wei F., Wang X., Liu G., Wang H.** (2009). Increasing seed mass and oil content in transgenic *Arabidopsis* by the overexpression of a *wri1*-like gene from *Brassica napus*. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 9-15.
- Liu Z., Erhan S.Z., Akin D.E., Barton F.E.** (2006). "Green" composites from renewable resources : preparation of epoxidized soybean oil and flax fiber composites. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2134-2137.
- Lligadas G., Ronda J.C., Galià M., Cadiz V.** (2006). Bionanocomposite from renewable resources: epoxidized linseed oil-polyhedral oligomeric silsesquioxanes hybrid materials. *Biomacromolecule.* 7, 3521-3526.

- Lonien J., Schwender J.** (2009). Analysis of metabolic flux phenotypes for two *Arabidopsis* mutants with severe impairment in seed storage lipid synthesis. *Plant Physiol.* **151**, 1617–1634.
- Lorenc-Kukula K., Amarowicz R., Oszmianski J., Doermann P., Starzyki M., Skala J., Zuk M., Kulma A., Szopa J.** (2005). Pleiotropic Effect of Phenolic Compounds Content Increases in Transgenic Flax Plant. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 3685-3692.
- Lotan T., Ohto M., Matsudaira Yee K., West MAL., Lo R., Kwong RW., Yamagishi K., Fischer RL, Goldberg R.B., Harada J.J.** (1998). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell.* **93**, 1195–1205.
- Lu C., Xin Z., Ren Z., Miquel M., Browse J.** (2009). An enzyme regulating triacylglycerol composition is encoded by the *ROD1* gene of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **106**, 18837–18842.
- Lu D. Y., Tsao Y. Y., Leung Y.M., Su K. P.** (2010). Docosahexaenoic acid suppresses neuroinflammatory responses and induces heme oxygenase-1 expression in BV-2 microglia: implications of antidepressant effects for omega-3 fatty acids. *Neuropsychopharmacology.* **35**, 2238-2248.
- Madsen E.B., Madsen L.H., Radutoiu S., Olbryt M., Rakwalska M., Szczyglowski K., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J.** (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature.* **425**, 637–640.
- Marita J.M., Ralph J., Hatfield R.D., Guo D., Chen F., Dixon R.A.** (2003). Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. *Phytochemistry.* **62**, 53-65.
- Massaro M., Scoditti E., Carluccio M.A., De Caterina R.** (2010). Nutraceuticals and prevention of atherosclerosis : focus on omega-3 polyunsaturated and prevention of atherosclerosis : focus on omega-3 polyunsaturated fatty acids and Mediterranean diet polyphenols. *Cardiovasc. Ther.* **28**, 13-19.
- Mendu V., Griffiths J. S., Persson S., Stork S., Downie B., Voiniciuc C., Haughn G.W. DeBolt S.** (2011). Subfunctionalization of Cellulose Synthases in Seed Coat Epidermal Cells Mediates Secondary Radial Wall Synthesis and Mucilage Attachment. *Plant Physiol.* **157**, 441–445.
- Meinke D. W., Franzmann L. H., Nickle T C, Yeung E. C.** (1994). *Leafy Cotyledon* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **6**, 1049–1064.
- MetaLipPro.** (2012-2015). *Métabolisme lipidique chez les plantes et les levures.* Dans l'ITE PIVERT-GENESYS.
- Metropolis N., Ulham S.** (1949). The monte carlo method. *Journal of the American Statistical Association (American Statistical Association).* **44(247)**: 335-341.

**Meyer K., Stecca K.L., Ewell-Hicks K., Allen S.M, Everard J.D.** (2012). Oil and protein accumulation in developing seed is influenced by the expression of a cytosolic pyrophosphatase in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **159**, 1221-1234.

**Meyermans H., Morreel K., Lapierre C., Pollet B., De Bruyn A., Busson R., Herdewijn P., Devreese B., Van Beeumen J., Marita J.M.** (2000). Modifications in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon downregulation of caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis. *J Biol Chem.* **275**, 36899-36909.

**Miart F., Acket S., Blondiaux M., Baldwin L., Bouton S., Fournet F., Van Wuytswinkel O., Roullard R., Fontaine JX., Moline R., Petit E., Thomasset B., Mesnard F., Pageau K.** (2014). La graine de lin: vers la compréhension de la voie de biosynthèse du mucilage et des interactions tégument-embryon au cours du développement. Dans le 5<sup>ème</sup> meeting du "French Flax Research Networks", Chartres, 20 mai 2014, France.

**Miart F., Pageau K., Fournet F., Fontaine J.X., Bouton S., Van Wuytswinkel O., Thomasset B., Mesnard F.** (2013). Analysis of the interactions between mucilage composition and fatty acid content in flaxseed. Dans "The XIIIth Cell Wall Meeting", Nantes, 7-12 juillet 2013, France.

**Miart F., Pageau K., Roullard R., Fontaine JX., Moline R., Petit E., Bouton S., Fournet F., Van Wuytswinkel O., Thomasset B., Mesnard F.** (2014). Metabolomic analysis of the interactions between seed coat and embryo of flaxseed. Dans les 10<sup>e</sup> journées du Réseau Français des Parois, Amiens, 7 au 9 juillet 2014, France.

**Mohnen D.** (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol.* **11**, 266–277

**Moriana R., Vilaplana F., Karlsson S., Ribes A.** (2014). Correlation of chemical, structural and thermal properties of natural fibres for their sustainable exploitation. *Carbohydr Polym.* **112**, 422-431.

**Morot-Gaudry J.F., Job D., Lea P. J.** (2001). Amino acid metabolism. Dans Nitrogen Assimilation by Plants, Science Publishers Inc, Morot-Gaudry J.F. Ed, Enfield, 167-211.

**Morris H.M.** (2007). Flax: A health and nutrition primer. *Flax Council of Canada, Winnipeg, Canada.* **15** : pp140.

**Moss G. P.** (2000). Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000). *Pure Appl. Chem.* **72**, 1493-1523.

**Mu J., Tan H., Zheng Q., Fu F., Liang Y., Zhang, J., Yang X., Wang T., Chong K., Wang X., Zuo J.** (2008). LEAFY COTYLEDON1 is a key regulator of fatty acid biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* **148**, 1042–1054.

- Nanchen A., Fuhrer T. et Sauer U.** (2007). Metabolomics: Methods and protocols, in W. Weckwerth (Eds.), Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 177.
- Naran R., Chen G., Carpita N.C.** (2008). Novel Rhamnogalacturonan I and Arabinoxylan Polysaccharides of Flax Seed Mucilage. *Plant Physiol.* 148, 132–141.
- Nesi N., Debeaujon I., Jond C., Pelletier G., Caboche M., Lepiniec L.** (2000). The TT8 gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of DFR and BAN genes in *Arabidopsis* siliques. *Plant Cell.* 12, 1863-1878.
- Nesbitt P.D., Lam Y., Thompson L.U.** (1999). Human metabolism of mammalian lignan precursors in raw and processed flaxseed. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 549-555.
- Ohashi Y., Oka A., Rodrigues-Pousada R., Possenti M., Ruberti I., Morelli G., Aoyama T.** (2003). Modulation of phospholipid signaling by GLABRA 2 in root-hair pattern formation. *Science.* 300, 1427-1430.
- O'Grady J., Schwender J., Shachar-Hill Y., Morgan J.A.** (2012). Metabolic cartography: experimental quantification of metabolic fluxes from isotopic labeling studies. *J. Exp. Bot.* 63, 2293–2308.
- Ohlrogge J., Browse J.** (1995). Lipid Biosynthesis. *Plant Cell.* 7, 957-970.
- Ohlrogge J., Jaworski J.G.** (1997). Regulation of fatty acid synthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48, 109-136.
- Omer S., Kumar S., Khan B. bM.** (2013). Over-expression of a subgroup 4 R2R3 type MYB transcription factor gene from *Leucaena leucocephala* reduces lignin content in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep.* 32, 161–171.
- Onidol/Cetiom.** (2010). L'avenir de la filière du lin oléagineux français. 1-6.
- Oomah B.D., Kenaschuk E.O., Cui W., Mazza G.** (1995). Variation in the composition of water soluble polysaccharides in flaxseed. *J. Agric. Food. Chem.* 43, 1484-1488.
- Oomah B.D., Mazza G., Kenaschuk E.O.** (1996). Flavonoid content of the flaxseed, influence of cultivar and environment. *Euphytica.* 90, 163-167.
- Oomah B.D., Mazza G.** (1993). Flaxseed proteins—a review. *Food Chemistry.* 48, 109-114.
- Oomah B.D.** (2003). Processing of flaxseed fiber, oil protein, and lignan. *Flaxseed in Human Nutrition*, Second Edition. Eds Thompson, L. U., Cunnane S. C., AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 20. Pp 363-387.

**Overem A., Buisman G.J.H., Derksen J.T.P., Cuperus F.P., Molhoek L., Grisnich W., Goemans G.** (1999) Seed oils rich in linolenic acid as renewable feedstock for environment-friendly crosslinkers in powder coatings. *Ind Crops Prod.* 10, 157-165.

**Parcy F., Valon C., Raynal M., Gaubier-Comella P., Delseny M., Giraudat J.** (1994). Regulation of gene expression programs during Arabidopsis seed development: roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell.* 6, 1567–1582.

**Paschos G.K., Yiannakouris N., Rallidis L.S., Davies I. Griffin B.A.** (2005). Apolipoprotein E genotype in dyslipidemic patients and response of blood lipids and inflammatory markers to alpha-linolenic acid. *Angiology.* 56, 49-60.

**Paschos G.K., Magkos F., Panagiotakos D.B., Votteas V., Zampelas A.** (2007). Dietary supplementation with flaxseed oil lowers blood pressure in dyslipidaemic patients. *Eur. J. Clin. Nutr.* 61, 1201-1206.

**Payne C. T., Zhang F., Lloyd A. M.** (2000). GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in arabidopsis through interaction with GL1 and TTG1. *Genetics.* 156, 1349-1362.

**Pelloux J., Rusterucci C., Mellerowicz E. J.** (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci.* 12, 267–277.

**Pincon G., Maury S., Hoffmann L., Geoffroy P., Lapierre C., Pollet B., Legrand M.** (2001). Repression of O-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth. *Phytochem.* 57, 1167-1176.

**Plant Biosafety Office.** (1994). The Biology of *Linum usitatissimum* L. (Flax). *Canadian Food Inspection Agency.* 10, 1-10.

**Plaxton W.C., Podestá F.E.** (2006). The functional organization and control of plant respiration. *Crit Rev Plant Sci.* 25, 159–198.

**Pleite R., Pike M.J., Garces R., Martinez-Force E., Rawsthorne S.** (2005). The sources of carbon and reducing power for fatty acid synthesis in the heterotrophic plastids of developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) embryos. *J. Exp. Bot.* 56, 1297–1303.

**Popova I.E., Hall C., Kubátová A.** (2009). Determination of lignans in flaxseed using liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromato. A.* 1216, 217-229.

**Pouvreau B., Baud S., Vernoud V., Morin V., Py C., Gendrot G., Pichon J.P., Rouster J., Paul W., Rogowsky P.M.** (2011). Duplicate maize *Wrinkled1* transcription factors activate target genes involved in seed oil biosynthesis. *Plant Physiol.* 156, 674-686.

**Prasad K.** (1997). Hydroxyl radical-scavenging property of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flax-seed. *Mol. Cell. Biochem.* 168, 117–123.

**Prasad K.** 2000. Antioxydant Activity of Secoisolariciresinol Diglucoside-derived Metabolites, Secoisolariciresinol, Enterodiol, and Enterolactone. *International Journal of Angiology*. 9, 220-225.

**Qiu S., Lu Z., Luyengi L., Lee S. K., Pezzuto J. M., Farnsworth N. R., Thompson L. U., Fong H. S.** 1999. Isolation and characterization of flaxseed (*Linum usitatissimum*) constituents. *Pharm. Biol.* 37, 1-7.

**Raggae S., Abdel-Aal E. S. M., et Noaman M.** (2006). Antioxidant activity and nutrient composition of selected cereals for food use. *Food Chemistry*. 98, 32–38.

**Rajani S., Sundaresan V.** (2001). The Arabidopsis myc/bHLH gene ALCATRAZ enables cell separation in fruit dehiscence. *Curr. Biol.* 11, 1914-1922.

**Rajesh J., Murthy K., Kumar M., Madhusudhan B., Ravishankar G.** (2006). Antioxidant potentials of flaxseed in vivo model. *J. Agr. Food Chem.* 54, 3794-3799.

**Rajwade A.V., Kadoo N.Y., Borikar S.P., Harsulkar A.M., Ghorpade P.B., Gupta V.S.** (2014). Differential transcriptional activity of SAD, FAD2 and FAD3 desaturase genes in developing seeds of linseed contributes to varietal variation in  $\alpha$ -linolenic acid content. *Phytochem.* 98, 41-53.

**Roesler K., Shintani D., Savage L., Boddupalli S., Ohlrogge J.** (1997). Targeting of the Arabidopsis homomeric acetyl-coenzyme A carboxylase to plastids of rapeseeds. *Plant Physiol.* 113, 75–81.

**Rolletschek H., Wedchke W., Weber H., Wobus U., Borisjuk L.** (2004). Energy state and its control on seed development: starch accumulation is associated with high ATP and steep oxygen gradients within barley grains. *J. Exp. Bot.* 55, 1351-1359.

**Roscher A., Kruger N.J., Ratcliffe R.G.** (2000). Strategies for metabolic flux analysis in plants using isotope labelling, *J. Biotechnol.* 77, 81–102.

**Routaboul J.M., Kerhoas L., Debeaujon I., Pourcel L., Caboche M., Einhorn J., Lepiniec L.** (2006). Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 224, 96-107.

**Ruuska S.A., Schwender J., Ohlrogge J.** (2004). The capacity of green oilseeds to utilize photosynthesis to drive biosynthetic processes, *Plant Physiol.* 136, 2700-2709.

**Ryden P., Sugimoto-Shirasu K., Smith A. C., Findlay K., Reiter W. D., McCann M. C.** (2003). Tensile properties of Arabidopsis cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked microfibrillar network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. *Plant Physiol.* 132, 1033–1040.

- Saeed A.I., Sharov V., White J., Li J., Liang W., Bhagabati N., Braisted J., Klapa M., Currier T., Thiagarajan M., Sturn A., Snuffin M., Rezantsev A., Popov D., Ryltsov A., Kostukovich E., Borisovsky I., Liu Z, Vinsavich A., Trush V., Quackenbush J.** (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*. 34, 374-378.
- Samac D.A., Litterer L., Temple G., Jung H.-J.G., Somers D.A.** (2004). Expression of UDP-glucose dehydrogenase reduces cell wall polysaccharide concentration and increases xylose content in alfalfa stems. *Appl. Biochem. Biotechnol. A: Enzyme Eng. Biotechnol.* 116, 1167–1182.
- Santos-Mendoza M., Dubreucq B., Baud S., Parcy F., Caboche M., Lepiniec L.** (2008). Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in Arabidopsis. *Plant J.* 54, 608-620.
- Sarmi M.P., et Cheymer V.** (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier. P 2 -10.
- Scheible W.R. et Pauly M.** (2004). Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Curr Opin Plant Biol.* 7, 285–295.
- Schwender, J.** (2008). Metabolic flux analysis as a tool in metabolic engineering of plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19, 131-137.
- Schwender, J.** (2011). Experimental flux measurements on a network scale. *Frontiers in Plant Sci*, 2:63. 1-7.
- Schwender J., Goffman F., Ohlrogge J., Shaschar-Hill Y.** (2004). Rubisco without the Calvin cycle improves the carbon efficiency of developing green seeds, *Nature*. 432, 779-782.
- Schwender J., Ohlrogge J. B., Shachar-Hill Y.** (2003). A flux model of glycolysis and the oxidative pentose phosphate pathway in developing *Brassica napus* embryos. *J. Biol. Chem.* 278, 29442-29453.
- Schwender J., Shachar-Hill Y., Ohlrogge, J. B.** (2006). Mitochondrial metabolism in developing embryos of *Brassica napus*. *J. Biol. Chem.* 281, 34040-34047.
- Shen B., Sinkevicius K.W., Selinger D.A., Tarczynski M.C.** (2006). The homeobox gene *GLABRA2* affects seed oil content in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 60, 377-387.
- Shen B., Allen W.B., Zheng P., Li C., Glassman K., Ranch J., Nubel D., Tarczynski M.C.** (2010). Expression of ZmLEC1 and ZmWRI1 increases seed oil production in maize. *Plant Physiol.* 153, 980-987.
- Shi L., Katavic V., Yu Y., Kunst L., Haughn G.** (2012). Arabidopsis *glabra2* mutant seeds deficient in mucilage biosynthesis produce more oil. *Plant J.* 69, 37-46.

**Shimada T.L., Shimada T., Takahashi H., Fukao Y., Hara-Nishimura I.** (2008). A novel role for oleosins in freezing tolerance of oilseeds in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 55, 798–809.

**Siloto R.M.P., Findlay K., Lopez-Villalobos A., Yeung E.C., Nykiforuk C.L., Moloney M.M.** (2006). The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 18, 1961–1974.

**Sidorov R.A., Tsydendambaev V.D.** (2014). Biosynthesis of fatty oils in higher plants. *Fiziologiya Rastenii.* 61, 3-22.

**Smith R.G., Gauthier D.A., Dennis D.T., Turpin D.H.** (1992). Malate-dependent and pyruvate-dependent fatty-acid synthesis in leukoplastids from developing castor endosperm. *Plant Physiol.* 98, 1233–1238.

**Snapp A.R., Lu C.** (2013). Engineering industrial fatty acids in oilseeds. *Frontiers in Biology.* 8 (3) : 323-332.

**Song X-Q., Li Q-T., Liu Y-F., Zhang F-X., Ma B., Zhang W-K., Man W-Q., Du W-G., Wang G-D., Chen S-Y., Zhang J-S.** (2013). Soybean GmbZIP123 gene enhances lipid content in the seeds of transgenic *Arabidopsis* plants. *J. Exp. Bot.* 14, 4329-4341.

**Sriram G., Fulton D.B., Iyer V.V., Peterson J.M., Zhou R.L., Westgate M.E., Spalding M.H., Shanks J.V.,** (2004). Quantification of compartmented metabolic fluxes in developing soybean embryos by employing Biosynthetic ally directed fractional C-13 labeling, [C-13, H-1] two-dimensional nuclear magnetic resonance, and comprehensive isotopomer balancing. *Plant Physiol.* 136, 3043–3057.

**Stadler R., Lauterbach C., Sauer N.** (2005). Cell-to-cell movement of green fluorescent protein reveals post-phloem transport in the outer integument and identifies symplastic domains in *Arabidopsis* seeds and embryos. *Plant Physiol.* 139, 701-712.

**Stasevich O.V., Mikhaleuk S.G., Kurchenko V.P.** (2009). Isolation of secoisolariciresinol diglucoside from lignan-containing extract of *Linum usitatissimum* seeds. *Chemistry of Natural Compounds.* 45, 21-23.

**Stone S.L., Kwong L.W., Yee K.M., Pelletier J., Lepiniec L., Fischer R.L., Goldberg R.B., Harada J.J.** (2001). *LEAFYCOTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 11806-11811.

**Stork J., Harris D., Griffiths J., Williams B., Beisson F., Li-Beisson Y., Mendu V., Haughn G., Debolt S.** (2010). *CELLULOSE SYNTHASE9* serves a nonredundant role in secondary cell wall synthesis in *Arabidopsis* epidermal testa cells. *Plant Physiol.* 153, 580–589.

**Strack D., Mock H.P.** (1993). Hydroxycinnamic acids and lignins. *Methods in Plant Biochemistr.* 9, 45-49.

**Stracke R., Werber M., Weisshaar B.** (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Bio.* 4,447-456.

**Struijs K., Vincken J.P., Verhoef R., van Oostveen-van Casteren W.H., Voragen A.G., Gruppen H.** (2007). The flavonoid herbacetin diglucoside as a constituent of the lignan macromolecule from flaxseed hulls. *Phytochem.* 68, 1227-1235.

**Sturm A.** (1999). Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiol.* 121, 1-8.

**SYSMETAB.** (2006-2008). Approche système pour la compréhension de réseaux métaboliques et leur modification en vue de leur exploitation rationnelle. Dans l'Axe prospectif Système et Vivant de l'UTC.

**Szyperski T.** (1995). Biosynthetically directed fractional <sup>13</sup>C-labeling of proteinogenic amino acids. An efficient analytical tool to investigate intermediary metabolism. *Eur. J. Biochem.* 232, 433-448.

**Tan H., Yang X., Zhang F., Zheng X., Qu C., Mu J., Fu F., Li J., Guan R., Zhang H., Wang G., Zuo J.** (2011). Enhanced Seed Oil Production in Canola by Conditional Expression of *Brassica napus* LEAFY COTYLEDON1 (BnLEC1) and LEC1-LIKE (BnL1L) in Developing Seeds. *Plant Physiol.* 156, 1577-1588.

**Taylor D.C., Katavic V., Zou J-T., MacKenzie S.L., Keller W.A., An J.** (2001). Field-testing of transgenic rapeseed cv. Hero transformed with a yeast sn-2 acyltransferase results in increased oil content, erucic acid content and seed yield. *Mol Breeding.* 8, 317-322.

**Taylor D.C., Zhang Y., Kumar A., Francis T., Giblin E.M., Barton D.L.** (2009). Molecular modification of triacylglycerol accumulation by over-expression of DGAT1 to produce canola with increased seed oil content under field conditions. *Botany.* 87, 533-543.

**Thomas P.D., Campbell M.J., Kejariwal A., Mi H., Karlak B., Daverman R., Diemer K., Muruganujan A., Narechania A.** (2003). PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function. *Genome Res.* 13, 2129-2141.

**To A., Joubès J., Barthole G., Lécureuil A., Scagnelli A., Jasinski S., Lepiniec L., Baud S.** (2012). WRINKLED transcription factors orchestrate tissue-specific regulation of fatty acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 24, 5007-5023.

**To A., Valon C., Savino G., Guilleminot J., Devic M., Giraudat J., Parcy F.** (2006). A network of local and redundant gene regulation governs *Arabidopsis* seed maturation. *Plant Cell.* 18, 1642-1651.

**Troufflard S.** (2004). Etude du métabolisme carboné dans les embryons de lin oléagineux lors de l'accumulation des réserves lipidiques. Thèse de l'Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France.

- Troufflard S., Roscher A., Thomasset B., Barbotin J-N., Rawsthorne S., Portais J-C.** (2007). In vivo <sup>13</sup>C NMR determines metabolic fluxes and steady state in linseed embryos, *Phytochemistry*. 68, 2341–2350.
- Tsuchiya Y., Nambara E., Naito S., McCourt P.** (2004). The FUS3 transcription factor functions through the epidermal regulator TTG1 during embryogenesis in Arabidopsis. *Plant J.* 37, 73-81.
- Tusher V.G., Tibshirani R., Chu G.** (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(9): 5116-5121.
- Uauy R.P., Perano D., Hoffman P., Mena D., Birch E.** (1996). Role of essential fatty acids in the function of the developing nervous system. *Lipids, Suppl.* 10, 167-176.
- Ülker B., et Somssich I.E.** (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 491-498.
- USDA, Oilseeds** : World markets and trade monthly circular. Bd USDA, Foreign agricultural services, Washington, DC 2013.
- Vaisey-Genser M.A., Morris D.** (2003). Introduction History of the cultivation and uses of flaxseed. Flax, The genus *Linum*. Eds Muir, A.D., Westcott N., D. CRC Press. 34, 1-12.
- Van de Mark M., Sandefur K.** (2005). Vegetable oils in paint and coatings. *Industrial Uses of Vegetable Oil*. Eds Erhan, S., AOCs Publishing, Champaign, Illinois, USA, pp 143–162.
- Van Erp H., Kelly A.A., Menard G., Eastmond J.P.** (2014). Multigene Engineering of Triacylglycerol Metabolism Boosts Seed Oil Content in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 165, 30-36.
- Venglat P., Xiang D., Qiu Q., Stone L.S., Tibiche C., Cram D., Alting-Mees M., Nowak J., Cloutier S., Deyholos M., Bekkaoui F., Sharpe A., Wang E., Rowland G., Selvaraj G., Dalta R.** (2011). Gene expression analysis of flax seed development. *BMC Plant Biology*. 11 (74) : 11-14.
- Vigeolas H., Geigenberger P.** (2004). Increased levels of glycerol-3-phosphate lead to a stimulation of flux into triacylglycerol synthesis after supplying glycerol to developing seeds of *Brassica napus* L. in planta. *Planta*. 219, 827-835.
- Vigeolas H., Hühn D., Geigenberger P.** (2011). Nonsymbiotic hemoglobin-2 leads to an elevated energy state and to a combined increase in polyunsaturated fatty acids and total oil content when overexpressed in developing seeds of transgenic Arabidopsis plants. *Plant Physiol.* 155, 1435-1444.
- Vigeolas H., van Dongen J.T., Waldeck P., Huhn D., Geigenberger P.** (2003). Lipid storage metabolism is limited by the prevailing low oxygen concentrations within developing seeds of oilseed rape, *Plant Physiol.* 133, 2048–2060.

- Vigeolas H., Waldeck P., Zank T., Geigenberger P.** (2007). Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus* L.) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seed-specific promoter. *Plant Biotech. J.* 5, 431-441.
- Vrinten P., Hu Z., Munchinsky MA., Rowland G., Qiu X.** (2005). Two FAD3 desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed. *Plant Physiol.* 139, 79-87.
- Wanasundara P.K., Shahidi. F.** (1997). Removal of flaxseed mucilage by chemical and enzymatic treatments. *Food Chemistry.* 59, 47-55.
- Wang H.W., Zhang B., Hao Y.J., Huang J., Tian A.G., Liao, Y., Zhang J.S. and Chen S.Y.** (2007). The soybean Dof-type transcription factor genes, *GmDof4* and *GmDof11*, enhance lipid content in the seeds of transgenic Arabidopsis plants. *Plant J.* 53, 716–729.
- Wang Z., Hobson N., Galindo L., Zhu S., Shi D., McDill J., Liao Y., Yang L., Hawkins S., Neutelings G., Datia R., Lambert G., Galbraith D. W., Grassa C.J., Gerald A., Cronk Q.C., Cullis C., Dash P.K., Kumar P.A., Cloutier S., Sharpa A.G., Wong G.K., Wang J., Deyhi-olos M.K.** (2012). The genome of flax (*Linum usitatissimum*) assembled *de novo* from short shotgun sequence reads. *Plant J.* 72(3):461-473.
- Warrand J., Michaud P., Picton L., Muller G., Courtois B., Ralainirina R., Courtois J.** (2003). Large-scale purification of water-soluble polysaccharides from flaxseed mucilage, and isolation of a new anionic polymer. *Chromatographia.* 58, 331-335.
- Weselake R.J., Taylor D.C., Rahman M.H., Shah S., Laroche A., McVetty P.B., Harwood J.L.** (2009). Increasing the flow of carbon into seed oil. *Biotech. Ad.* 27, 866-878.
- Western T.L., Young D.S., Dean G.H., Tan W.L., Samuels A.L., Haughn G.W.** (2004). *MUCILAGE-MODIFIED4* encodes a putative pectin biosynthetic enzyme developmentally regulated by APETALA2, TRANSPARENT TESTA GLABRA1, and GLABRA2 in the Arabidopsis seed coat. *Plant Physiol.* 134, 296-306.
- Wiechert W.** (2001). 13C metabolic flux analysis. *Met Eng.* 3, 195-206.
- Windsor J.B., Symonds V.V., Mendenhall J., Lloyd A.M.** (2000). Arabidopsis seed coat development: morphological differentiation of the outer integument. *Plant J.* 22, 483-493.
- Wrobel-Kwiatkowska M., Czemplik M., Kulma A., Zuk M., Kaczmar J., Dyminska L., Hanuza J., Ptak M., Szopa J.** (2012). New biocomposites based on bioplastic flax fibers and biodegradable polymers. *Biotechnol. Prog.* 28, 1336-1346.
- Xu J., Carlsson A. S., Francis T., Zhang M., Hoffman T., Giblin M. E., Taylor D. C.** (2012). Triacylglycerol synthesis by PDAT1 in the absence of DGAT1 activity is dependent on reacylation of LPC by LPCAT2. *BMC Plant Biol.* 12 (4) : 1-22.

**Yamamoto A., Kagaya Y., Usui H., Hobo T., Takeda S., Hattori T.** (2010). Diverse roles and mechanisms of gene regulation by the Arabidopsis seed maturation master regulator FUS3 revealed by microarray analysis. *Plant Cell Physiol.* 51, 2031–2046.

**Yanagisawa S.** (2002). The Dof family of plant transcription factors. *Trends in Plant Science*, 7, 555-560.

**Zeng Y., Tan X., Zhang L., Jiang N., Cao H.** (2014). Identification and Expression of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase Genes and their Relations to Oil Content in Developing Seeds of Tea Oil Tree (*Camellia oleifera*). *PLOS ONE.* 9, 1-9.

**Zhang F., Gonzalez A., Zhao M., Payne C.T., Lloyd A.** (2003). A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis. *Development.* 130, 4859-4869.

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

**Zheng P., Allen W.B., Roesler K., Williams M.E., Zhang S., Li J., Glassman K., Ranch J., Nubel D., Solawetz W.** (2008) A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize. *Nat Genet.* 40, 367–437.

**Zhong R., Iii W.H., Negrel J., Ye Z.H.** (1998). Dual methylation pathways in lignin biosynthesis. *Plant Cell.* 10, 2033-2046.

**Zhong R., Morrison W.H., Himmelsbach D.S., Poole F.L., Ye Z.H.** (2000). Essential role of caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase in lignin biosynthesis in woody poplar plants. *Plant Physiol.* 124, 563-578.

**Zuk M., Kulma A., Dymińska M., Szoltysek K., Prescha A., Hanuza J., Szopa J.** (2011). Flavonoid engineering of flax potentiate its biotechnological application. *BMC Biotechnology* 2011. **11** (10) : 1-19.

**Zuk M., Prescha A., Stryczewska M., Szopa J.** (2012). Engineerinf Flax Plants To Increase Antioxydant Capacity and Improve Oil Composition and Stability. *J. Agric. Food Chem.* 60, 5003-5012.

**ANNEXES****Annexe 1 : Différence d'expression des gènes exprimés dans les téguments de lin à 24 JAF entre *Astral* et 238 codant pour des enzymes de la synthèse et de la modification des parois végétales et des proanthocyanidines à 16, 38 JAF dans les téguments.**

GENE ID	Log2ratio (16 JAF)	Log2ratio (38 JAF)	Gene description
genolin_c24137 184	0,84	-0,08	pectin methylesterase (pme3)
genolin_c22036 371	0,55	-0,33	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase
genolin_c45971 212	1,24	0,15	Glucosyltransferase
genolin_c28772 325	0,11	-0,44	glutathione S-transferase
genolin_c19694 483	0,55	-0,63	WD40-like
genolin_c13922 211	-0,08	-0,02	UDP-glucose dehydrogenase
genolin_c21175 630	0,55	-0,12	Secondary cell wall-related glycosyltransferase family 14
genolin_c17518 549	-0,50	-0,52	Endo-1,4-beta-glucanase
genolin_c26492 285	-0,58	-0,19	Secondary cell wall-related glycosyltransferase family 14
genolin_c59534 291	0,06	0,01	dihydroflavonol reductase
genolin_c1510 778	-0,36	0,05	Cellulose synthase
genolin_c31895 293	-0,12	0,40	Cellulose synthase
genolin_c54928 319	-1,09	-0,83	WD40-like
genolin_c313 781	-0,61	-0,06	Glutathione S-transferase
genolin_c18438 413	1,65	-0,18	Cellulose synthase
genolin_c42771 268	-0,89	0,66	Flavanone 3-hydroxylase

Log2 ratio a été calculé comme intensité de signal dans *Astral* vs 238.

**Annexe 2 : Différence d'expression des gènes différentiellement exprimés dans les téguments de lin à 24 JAF entre *Astral* et 238 codant pour des enzymes du métabolisme carboné, des facteurs de transcription et des gènes codant pour les facteurs de transcription LEC1, LEC2, WRI1, DOF, ABI3, FUS3, GL2, FIE, PHE, MINI3, IKU2 à 16, 38 JAF dans les téguments.**

GENE ID	Log2ratio (16 JAF)	Log2ratio (38 JAF)	Gene description
genolin_c58874 298	1,84	-0,48	Glutamine synthetase
genolin_c54022 317	1,10	0,22	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase 2
genolin_c13745 369	2,20	0,86	BZIP transcription factor
genolin_c10173 499	-0,16	-0,41	ATP/ADP transport protein 2
genolin_c5577 508	0,99	-1,05	Ribitol dehydrogenase
genolin_c55006 307	0,77	-0,32	MYB transcription factor MYB161
genolin_c58939 348	0,23	-0,19	SNF1-related protein kinase
genolin_c48720 327	0,33	-0,32	Nitrite reductase
genolin_c49953 336	1,00	-0,40	Dof15
genolin_c45975 306	-1,08	-0,32	MYB transcription factor MYB172
genolin_c42355 213	-0,02	-0,34	MYB transcription factor MYB161
genolin_c49244 277	-0,71	0,24	Asparagine synthetase
genolin_c2962 3234	0,91	0,31	Trehalose 6-phosphate synthase
genolin_c17745 729	0,33	-0,26	DOF4,6
genolin_c57680 259	-0,81	-0,21	Dof28
genolin_c22329 947	0,05	0,14	DOF4,6
genolin_c33994 382	-0,35	-0,05	Dof22
genolin_c23412 495	-0,29	-0,16	Dof zinc finger protein DOF2,4
genolin_c12473 955	-0,39	0,13	Dof1
genolin_c25287 430	-1,02	-0,15	Dof zinc finger protein
genolin_c14354 925	-0,18	0,06	Dof22
genolin_c9992 910	0,13	-0,24	GLABRA2 expression modulator
genolin_c13401 828	-0,86	-0,15	Dof-type
genolin_c48032 197	-0,54	-0,26	Transcription factor LEC1-B
genolin_c23464 589	-0,37	0,56	Abscisic acid insensitive
genolin_c34516 363	-0,20	-0,09	Dof13
genolin_c49570 254	-0,19	-0,16	Dof domain, zinc finger family protein
genolin_c6735 1250	0,54	0,04	FUSCA3
genolin_c9194 400	-0,54	-0,48	Dof1
genolin_c18069 440	-0,52	-0,46	WRINKLED1-like protein

GENE ID	Log2ratio (16 JAF)	Log2ratio (38 JAF)	Gene description
genolin_c10302 1280	-0,05	-0,07	LEC14B homolog
genolin_c15113 368	0,15	0,54	FIE
genolin_c24412 794	-0,31	-0,27	Zinc finger, Dof-type
genolin_c6712 951	0,28	-0,25	LEC1-like protein
genolin_c28269 231	-1,25	0,20	L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase
genolin_c43581 210	-0,40	0,20	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase

Log2 ratio a été calculé comme intensité de signal dans *Astral* vs 238.

**Annexe 3 : Différence d'expression des gènes différentiellement exprimés dans les embryons de lin à 24 JAF entre *Astral* et 238 codant pour des transporteurs à 32, 38 JAF dans les embryons.**

GENE ID	Log2ratio (32 JAF)	Log2ratio (38 JAF)	Gene description
genolin_c18105 363	0,24	-0,26	General substrate transporter; Sugar transporter superfamily
genolin_c45377 311	0,85	0,05	ATP-binding cassette transporter AtABCA1
genolin_c10753 576	0,12	0,26	Transporter-like protein
genolin_c36604 273	-0,19	0,00	Sugar transporter ERD6-like 5
genolin_c45644 259	0,06	-0,21	Putative phosphate transporter 1
genolin_c41500 348	-0,16	0,32	Hexose transporter
genolin_c7854 666	-0,25	0,14	Transport protein subunit-like
genolin_c44425 255	-0,05	-0,18	ATP-binding cassette transporter AtABCA1
genolin_c45967 285	0,41	-0,22	ATP-binding cassette transporter AtABCA1
genolin_c40390 230	-0,37	-0,11	Amino acid transport protein AAT1
genolin_c22289 318	-0,33	-0,22	Putative amino acid transporter protein
genolin_c24867 290	0,27	0,01	Putative polyol transported protein 2
genolin_c10110 1247	0,40	0,19	Nitrite transporter

Log2 ratio a été calculé comme intensité de signal dans *Astral* vs 238.

**Annexe 4 : Différence d'expression des gènes différentiellement exprimés dans les embryons de lin à 24 JAF entre *Astral* et 238 codant pour des protéines de stockages à 32, 38 JAF dans les embryons.**

GENE ID	Log2ratio (32 JAF)	Log2ratio (38 JAF)	Gene description
genolin_c50538 199	-0,54	0,20	conlinin (cnl1 gene)
genolin_c25652 307	0,16	-0,02	conlinin (cnl2 gene)
genolin_c34310 203	-0,96	1,25	conlinin (cnl1 gene)
genolin_c24272 321	0,80	0,10	Conlinin
genolin_c46853 171	0,44	-0,73	oleosin high molecular weight isoform (G4)
genolin_c8811 701	0,36	-0,11	Legumin-like protein
genolin_c27476 364	0,25	-1,45	Legumin B
genolin_c58146 179	0,19	-0,17	oleosin low molecular weight isoform (9I) mRNA
genolin_c34460 353	-0,05	-1,28	oleosin high molecular weight isoform (G3) gene
genolin_c53852 192	0,19	-0,02	conlinin (cnl2 gene)
genolin_c357 1789	0,09	-0,29	Legumin-like protein
genolin_c58743 514	-0,80	0,45	Legumin
genolin_c34497 190	0,42	-0,77	conlinin (cnl1 gene)
genolin_c9252 232	0,17	-0,08	conlinin (cnl2 gene)
genolin_c566 746	1,06	-1,65	Oleosin low molecular weight isoform
genolin_c55834 198	-0,04	-0,24	conlinin (cnl2 gene)
genolin_c58762 372	0,24	0,34	Legumin B
genolin_c49931 151	0,29	0,22	cnl2 gene
genolin_c21404 514	0,59	-0,03	Steroleosin
genolin_s21656 87	0,14	-0,02	conlinin (cnl2 gene)
genolin_c46994 229	0,17	-0,18	Conlinin
genolin_c37119 261	0,38	0,26	Conlinin

Log2 ratio a été calculé comme intensité de signal dans *Astral* vs 238.

**Annexe 5 : Différence d'expression des gènes différentiellement exprimés dans les embryons de lin à 24 JAF entre *Astral* et 238 codant pour des enzymes du métabolisme carboné à 32, 38 JAF dans les embryons.**

GENE ID	Log2ratio (32 JAF)	Log2ratio (38 JAF)	Gene description
genolin_c54022 317	-0,85	-0,12	DHAP synthase p
genolin_c56523 320	0,99	-0,25	Acetyl-CoA carboxylase carboxyltransferase beta
genolin_c58874 298	0,37	-0,74	Glutamine synthetase
genolin_c41360 228	-0,22	0,29	Fructose-bisphosphate aldolase
genolin_c10552 470	-0,10	-0,57	Aconitate hydratase
genolin_c10324 594	0,78	0,73	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
genolin_c1366 869	-0,36	0,07	Pyruvate dehydrogenase
genolin_c49244 277	1,03	0,49	Asparagine synthetase
genolin_c4412 908	0,66	0,36	Ribulose bisphosphate carboxylase
genolin_c9583 1312	0,01	0,15	Malic enzyme
genolin_c26135 578	0,28	-0,26	Fructose-bisphosphate aldolase
genolin_c52885 293	0,09	0,03	Aconitase
genolin_c58574 214	-0,37	0,02	Glutamine synthetase
genolin_c6357 1530	-0,13	-1,10	Glutamate synthase [NADH]
genolin_c25177 432	-1,70	0,46	Cellulose synthase-like protein D4
genolin_c51232 303	-0,33	0,16	Fructose-bisphosphate aldolase

Log2 ratio a été calculé comme intensité de signal dans *Astral* vs 238. Les gènes surexprimés dans les embryons d'*Astral* par rapport à 238 ( $\log_2\text{ratio} > 2$ ) sont représentés en rouge. Les gènes surexprimés dans les embryons 238 par rapport à *Astral* ( $\log_2\text{ratio} > -2$ ) sont représentés en vert.

**Annexe 6 : Différence d'expression des gènes différentiellement exprimés dans les embryons de lin à 24 JAF entre *Astral* et 238 codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse *de novo* à 32, 38 JAF dans les embryons.**

GENE ID	Log2ratio (32 JAF)	Log2ratio (38 JAF)	Gene description
genolin_c58747 320	-0,57	-0,16	Fatty acid desaturase 3A
genolin_c32030 289	-0,02	0,57	Delta12-fatty acid desaturase
genolin_c13821 432	0,28	0,33	Omega-3 fatty acid desaturase. chloroplastic
genolin_c28645 231	0,11	0,10	FAS2

Log2 ratio a été calculé comme intensité de signal dans *Astral* vs 238.

**Annexe 7 : Différence d'expression des gènes codant pour des enzymes de la voie Kennedy dans les embryons de lin à 24, 32, 38 JAF entre Astral et 238.**

GENE ID	log2ratio (24 JAF)	log2ratio (32 JAF)	log2ratio (38 JAF)	Gene description
genolin_c13425 960	-1,64	0,06	0,43	Glycerol-3-phosphate acyltransferase
genolin_c14364 603	-0,51	0,17	-0,02	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
genolin_c15136 1258	-0,67	0,04	-0,20	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
genolin_c17015 869	0,55	0,41	0,56	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase
genolin_c18229 263	-1,14	-0,36	0,23	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
genolin_c19784 616	-0,54	0,24	0,23	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 6
genolin_c24253 323	-0,25	0,06	-0,26	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
genolin_c24347 838	-0,02	-0,22	0,17	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase
genolin_c28079 230	1,27	0,62	-0,89	Glycerol-3-phosphate acyltransferase
genolin_c31810 397	-0,58	0,13	0,10	acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
genolin_c33811 435	-0,29	-0,27	0,27	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
genolin_c35768 456	1,31	-0,54	-0,46	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase
genolin_c4907 1734	-0,70	0,12	0,23	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4
genolin_c49533 443	1,37	1,12	0,89	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4
genolin_c5513 330	-0,39	-0,52	-0,01	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 6
genolin_c56799 393	-0,25	0,13	0,18	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase 1
genolin_c57378 317	-0,29	0,12	-0,15	Glycerol-3-phosphate acyltransferase
genolin_c9109 990	-0,08	-0,05	-0,08	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase
genolin_c4727 1437	0,24	-0,59	-0,85	Putative lysophosphatidic acid acyltransferase
genolin_c10976 1274	-0,43	-0,27	-0,09	Diacylglycerol acyltransferase
genolin_c11511 871	0,66	-0,26	-1,00	Diacylglycerol acyltransferase (Diacylglycerol acyltransferase 1)
genolin_c14524 522	-0,44	-0,95	-0,40	Diacylglycerol acyltransferase (Diacylglycerol acyltransferase 1)
genolin_c14599 443	-0,05	-0,05	-0,59	diacylglycerol acyltransferase
genolin_c1659 1315	-0,11	-0,69	-0,29	Diacylglycerol acyltransferase
genolin_c2977 1039	-0,84	-0,29	-0,75	Diacylglycerol acyltransferase (Diacylglycerol acyltransferase type-2)
genolin_c45017 698	-0,34	-0,28	-0,55	Diacylglycerol acyltransferase (Diacylglycerol acyltransferase 1)

Log2 ratio a été calculé comme intensité de signal dans *Astral* vs *238*. Les gènes surexprimés dans les embryons d'*Astral* par rapport à *238* ( $\log_2\text{ratio} > 2$ ) sont représentés en rouge. Les gènes surexprimés dans les embryons *238* par rapport à *Astral* ( $\log_2\text{ratio} > -2$ ) sont représentés en vert.

**Annexe 8 : Différence d'expression des gènes codant pour les facteurs de transcription LEC1, LEC2, WRI1, DOF, ABI3, FUS3, GL2, FIE, PHE, MINI3, IKU2, bZIP dans les embryons de lin Astral et 238 à 24, 32, 38 JAF.**

GENE ID	Log2ratio (24 JAF)	Log2ratio (32 JAF)	Log2ratio (38 JAF)	Gene description
genolin_c49953 336	1,65	0,01	-0,32	Dof15 mRNA
genolin_c48032 197	1,32	-0,40	0,27	Transcription factor LEC1-B

genolin_c33994 382	1,15	-0,85	-0,33	Dof22
genolin_c17745 729	0,59	0,29	-0,24	DOF4,6
genolin_c6735 1250	0,53	0,02	0,21	FUSCA3
genolin_c22329 947	0,30	0,19	0,30	DOF4,6
genolin_c34516 363	0,25	0,18	0,24	Dof13
genolin_c15113 368	0,00	0,00	-0,16	FIE
genolin_c13401 828	-0,02	-0,01	0,74	Dof-type
genolin_c6712 951	-0,03	-0,09	0,26	LEC1-like protein
genolin_c23412 495	-0,04	-0,14	0,21	Dof zinc finger protein DOF2,4
genolin_c49570 254	-0,17	-0,10	-0,05	Dof domain, zinc finger family protein
genolin_c10302 1280	-0,25	-0,06	-0,51	LEC14B homolog
genolin_c9194 400	-0,29	0,03	0,40	Dof1
genolin_c14354 925	-0,39	-0,26	-0,01	Dof22
genolin_c18069 440	-0,59	0,48	-0,18	WRINKLED1-like protein
genolin_c23464 589	-0,62	0,23	0,55	Abscisic acid insensitive
genolin_c57680 259	-0,62	0,14	0,64	Dof28
genolin_c12473 955	-0,73	0,19	0,28	Dof1
genolin_c9992 910	-1,05	0,04	0,00	GLABRA2 expression modulator
genolin_c25287 430	-1,16	0,66	0,70	Dof zinc finger protein
genolin_c24412 794	-1,25	0,00	0,11	Zinc finger, Dof-type
genolin_c13745 369	1,62	0,55	0,48	BZIP transcription factor
genolin_c25435 494	1,28	-0,27	0,52	BZIP transcription factor bZIP124
genolin_c21636 994	1,20	-0,39	-1,40	BZIP transcriptional repressor ROM1
genolin_c12678 804	0,94	-0,05	-1,66	BZIP transcription factor bZIP56
genolin_c19573 547	0,81	-0,03	-0,53	BZIP transcription factor bZIP78
genolin_c35803 356	0,69	-0,43	-0,04	Transcription factor bZIP63
genolin_c31539 585	0,60	0,27	0,19	BZIP transcription factor bZIP114
genolin_c31004 407	0,59	0,04	0,18	BZip transcription factor
genolin_c14663 961	0,55	-0,60	0,04	BZIP transcription factor ATB2
genolin_c29467 293	0,46	-0,68	0,22	BZIP transcription factor
genolin_c32258 357	0,43	-0,09	0,14	Transcription factor bZIP38
genolin_c4842 1004	0,31	0,14	0,02	Transcription factor bZIP53
GENE ID	Log2ratio (24 JAF)	Log2ratio (32 JAF)	Log2ratio (38 JAF)	Gene description
genolin_c10675 1026	0,29	0,22	-0,70	BZIP transcription factor bZIP99
genolin_c55603 435	0,24	0,15	0,22	BZIP transcription factor 14
genolin_c1901 1319	0,24	0,17	0,08	BZIP transcription factor bZIP109
genolin_c54157 352	0,22	-0,40	-0,39	BZIP transcription factor bZIP99
genolin_c6140 1257	0,21	0,10	-0,28	BZIP protein

genolin_c26364 1286	0,19	-0,19	-0,17	BZIP transcription factor ATB2
genolin_c25545 417	0,15	-0,11	0,01	BZIP protein
genolin_c11735 1436	0,15	-1,56	-2,03	BZIP transcription factor
genolin_c30109 493	0,15	0,40	0,63	BZIP transcription factor
genolin_c5935 1155	0,11	-0,28	0,13	BZIP transcription factor ATB2
genolin_c4063 1060	0,04	-0,43	-0,95	BZIP transcription factor bZIP109
genolin_c35084 512	0,00	-0,21	0,07	BZIP transcription factor bZIP62
genolin_c6166 445	-0,01	-0,15	-0,03	Transcription factor bZIP53
genolin_c25564 496	-0,05	0,15	-0,22	bZIP DNA-binding protein
genolin_c8488 1462	-0,12	-0,17	-0,13	Putative bZIP transcriptional activator
genolin_c38004 382	-0,13	-0,02	-0,09	Transcription factor bZIP38
genolin_c18546 1034	-0,14	-0,33	0,16	BZIP transcription factor bZIP80
genolin_c44896 293	-0,15	0,18	0,19	BZIP transcription factor bZIP80
genolin_c25714 617	-0,15	0,24	0,45	BZIP transcription factor bZIP28
genolin_c52120 272	-0,16	-0,12	-0,25	BZIP transcription factor protein
genolin_c23691 385	-0,19	0,28	-0,06	BZIP transcription factor bZIP117
genolin_c7860 969	-0,31	-0,25	-0,13	BZIP transcription factor bZIP114
genolin_c38202 283	-0,35	-0,16	-0,29	BZIP transcription factor bZIP77
genolin_c14018 618	-0,42	-0,09	0,12	BZIP transcription factor bZIP28
genolin_c36949 391	-0,45	-0,48	-0,14	BZIP DNA binding protein
genolin_c5467 1888	-0,45	-0,14	0,33	bZIP family transcription factor
genolin_c41924 225	-0,55	0,53	0,28	BZIP transcription factor bZIP11
genolin_c18475 596	-0,62	0,03	0,16	BZIP transcription factor
genolin_c7200 899	-0,63	0,49	0,34	BZIP protein
genolin_c15533 634	-0,64	-1,10	-0,50	Transcription factor bZIP34
genolin_c9545 941	-0,85	-1,16	-0,22	Transcription factor bZIP34
genolin_c17956 1152	-0,87	0,03	0,04	BZIP transcription factor
genolin_c3896 1038	-0,90	-0,42	-0,18	bZIP transcriptional activator
genolin_c41892 252	-1,07	0,43	0,31	BZIP DNA binding protein
genolin_c29159 264	-1,49	-0,07	-0,10	BZip transcription factor
genolin_c28868 856	-1,50	-0,35	0,36	BZIP protein

**Annexe 9 : Fichier ftbl correspondant à Astral.**

PROJECT

NAME	VERSION	FORMAT	DATE	COMMENT
Lin				

NETWORK

FLUX_NAME	EDUCT_1	EDUCT_2	PRODUCT_1	PRODUCT_2

[dd]

Vg_12	GLCext_12 #ABCDEF	GLCext #ABCDEF	
Vg_U	GLCext_U #ABCDEF	GLCext #ABCDEF	
Vg	GLCext #ABCDEF	GLC #ABCDEF	
Va	GLNext #ABCDE	GLN #ABCDE	
Vhk1	GLC #ABCDEF	G6P #ABCDEF	
Vgf	G6P #ABCDEF	F6P #ABCDEF	
Vsusy	GLC #ABCDEF	Fruc #abcdef	Suc #ABCDEFabcdef
Vsusyext	Suc #ABCDEFabcdef		Suc_Aux #ABCDEFabcdef
Vsusy2	F6P #ABCDEF		Fruc #ABCDEF
Vald	F6P #ABCDEF		TP #CBA TP #DEF
Vglyco	TP #ABC		PEP #ABC
Vfas2a	TP #ABC		G3P #ABC
Vfas2b	TP #ABC		G3P #CBA
Vfas2	G3P #ABC		G3P_Aux #ABC
Vpk	PEP		PYRc

	#ABC		#ABC	
Vpyr	PYRc #ABC		PYRm #ABC	
Vgl	GLN #ABCDE		GLU #ABCDE	
Vakg	GLU #ABCDE		AKG #ABCDE	
Vpep	PEP #ABC		PEPp #ABC	
Vstsp	H6Pp #ABCDEF		STA #ABCDEF	
Valdp	H6Pp #ABCDEF		TPp #CBA	TPp #DEF
Vglycp	TPp #ABC		PEPp #ABC	
Vpkp	PEPp #ABC		PYRp #ABC	
Vpdhp	PYRp #ABC		CO2 #A	AcCoAp #BC
Vfas1	AcCoAp #AB		AcCoAp_Aux #AB	
Vmep	MAL #ABCD		PYRp #ABC	CO2 #D
Vtcp	TP #ABC		TPp #ABC	
Vppp1	H6Pp #ABCDEF		CO2 #A	P5Pp #BCDEF
Vppp2	P5Pp #ABCDE	P5Pp #abcde	S7Pp #ABabcde	TPp #CDE

Vppp3	TPp #ABC	S7Pp #abcdefg	E4Pp #defg	H6Pp #abcABC
Vppp4	P5Pp #ABCDE	E4Pp #abcd	TPp #CDE	H6Pp #ABabcd
Vpdh	PYRm #ABC		CO2 #A	AcCoA #BC
Vcs	AcCoA #AB	OAA #abcd	CIT #ABabcd	
Vca	CIT #ABCDEF		ICIT #ABCDEF	
Viso	ICIT #ABCDEF		CO2 #C	AKG #FEDBA
Vsfa	AKG #ABCDE		CO2 #A	SUCC #BCDE
Vfum1	SUCC #ABCD		FUM #ABCD	
Vfum2	SUCC #ABCD		FUM #DCBA	
Vfum	FUM #ABCD		MAL #ABCD	
Vmdh	MAL #ABCD		OAA #ABCD	
Vme	OAA #ABCD		CO2 #D	PYRm #ABC
Vwall	G6P #ABCDEF		G6P_Aux #ABCDEF	
Vsta	STA #ABCDEF		STA_Aux #ABCDEF	
Vglueff	GLU #ABCDE		GLU_Aux #ABCDE	

Vasp	OAA #ABCD		ASP #ABCD	
Vaspeff	ASP #ABCD		ASP_Aux #ABCD	
Vser	TPp #ABC		SER #ABC	
Vsereff	SER #ABC		SER_Aux #ABC	
Vgly	SER #ABC		GLY #AB	CH4 #C
Vglyeff	GLY #AB		GLY_Aux #AB	
Vcheff	CH4 #A		CH4_Aux #A	
Vala	PYRc #ABC		ALA #ABC	
Valaeff	ALA #ABC		ALA_Aux #ABC	
Varo1	E4Pp #ABCD	PEPp #abc	ARO #abcABCD	
Varo2	E4Pp #ABCD	PEPp #abc	ARO #abDCBAc	
Vleu1	PYRp #ABC	PYRp #abc	LEU1 #abcBC	CO2 #A
Vleu	LEU1 #ABCDE	AcCoAp #ab	LEU #abBDEC	CO2 #A
Vleueff	LEU #ABCDEF		LEU_Aux #ABCDEF	
Vthr	ASP		THR	

	#ABCD		#ABCD	
Vthreff	THR #ABCD		THR_Aux #ABCD	
Vile	PYRp #ABC	THR #abcd	ILE #abBcdC	CO2 #A
Vileeff	ILE #ABCDEF		ILE_Aux #ABCDEF	
Vval	PYRp #ABC	PYRp #abc	VAL #abBcC	CO2 #A
Vvaleff	VAL #ABCDE		VAL_Aux #ABCDE	
Vphe	ARO #ABCDEFGF	PEPp #abc	PHE #abcBCDEFG	CO2 #A
Vpheeff	PHE #ABCDEFGH		PHE_Aux #ABCDEFGH	
Vtyr	ARO #ABCDEFGF	PEPp #abc	TYR #abcBCDEFG	CO2 #A
Vtyreff	TYR #ABCDEFGH		TYR_Aux #ABCDEFGH	
Vpro	GLU #ABCDE		PRO #ABCDE	
Vproeff	PRO #ABCDE		PRO_Aux #ABCDE	
Vlys	OAA #ABCD	PYRp #abc	LYS #ABCDbc	CO2 #a
Vlyseff	LYS #ABCDEF		LYS_Aux #ABCDEF	
Vhis	P5Pp #ABCDE	CH4 #a	HIS #aEDCBA	

Vhiseff	HIS #ABCDEF	HIS_Aux #ABCDEF		
FLUXES				
	NET			
	NAME	FCD	VALUE(F/C)	ED_WEIGHT
	Vg_U	F	274.1645869925912	
	Vglyco	F	604.2924873569436	
	Vfas2	F		2
	Vpep	F	342.7064804834902	
	Vglycp	F	-2279.853953768644	
	Vpkp	F	51.38	
	Vfas1	F	51.38	
	Vtcp	F	-606.2939808424459	
	Vppp1	F	1173.749710352265	
	Vme	F		0
	Vwall	F		0
	Vsta	F	1.300187500549748	
	Vglueff	F	0.06823505166536055	
	Vaspeff	F	617.6745171125933	
	Vsereff	F	3.866648271571579	
	Vglyeff	F	7.175063635464591	
	Vcheff	F	2.295190746751014	
	Valaeff	F		0
	Vthreff	F	0.4397834190359928	
	Vileeff	F		0
	Vvaleff	F		0
	Vpheeff	F	1.084286859743333	
	Vproeff	F	1.399951773650395	
	Vlyseff	F		0
	Vmep	C		0
	Vg_12	D		
	Vg	D		
	Va	D		
	Vhk1	D		
	Vgf	D		
	Vsusy	D		
	Vsusyext	D		
	Vsusy2	D		
	Vald	D		
	Vfas2a	D		
	Vfas2b	D		
	Vpk	D		

Vpyr	D
Vgl	D
Vakg	D
Vstsp	D
Valdp	D
Vpdhp	D
Vppp2	D
Vppp3	D
Vppp4	D
Vpdh	D
Vcs	D
Vca	D
Viso	D
Vsfa	D
Vfum1	D
Vfum2	D
Vfum	D
Vmdh	D
Vasp	D
Vser	D
Vgly	D
Vala	D
Varo1	D
Varo2	D
Vleu1	D
Vleu	D
Vleueff	D
Vthr	D
Vile	D
Vval	D
Vphe	D
Vtyr	D
Vtyreff	D
Vpro	D
Vlys	D
Vhis	D
Vhiseff	D

XCH

NAME	FCD	VALUE(F/C)	ED_WEIGHT
Vgf	F	0.00406920751744582	
Vsusy	F	0.49208759030184	
Vsusy2	F	0.00680326214204739	

Vald	F		0
Vglyco	F	0.999	
Vfas2b	F	0.999	
Vpyr	F	0.197960023041109	
Vgl	F	0.000140480109234973	
Vakg	F	0.999	
Vpep	C		0
Vstsp	F	0.00101763991754786	
Valdp	F		0
Vglycp	F		0
Vpkp	F	0.999	
Vpdhp	F	0.998438491879408	
Vtcp	F		0
Vcs	F	0.999	
Vca	F	0.999	
Viso	F	0.999	
Vsfa	F	0.999	
Vfum2	F	0.9059733789867	
Vfum	F	0.998835925792536	
Vmdh	F	0.951692821180632	
Vasp	F	0.00529194436342665	
Vser	F	0.999	
Vgly	F	0.999	
Vala	F	0.349682437337116	
Varo2	F		0
Vleu1	F	0.000221948058013966	
Vleu	F	0.00028578406624833	
Vthr	F		0
Vile	F	0.998438556787477	
Vval	F	0.000273827071147864	
Vphe	F	0.213673805045895	
Vtyr	F	0.0000115070261943132	
Vpro	F		0
Vlys	F	0.998438444547177	
Vhis	F	0.0000937275912298077	
Vg	C		0
Vfas1	C		0
Vme	C		0
Vmep	C		0
Vpdh	C		0
Vpk	C		0
Vppp1	C		0
Vppp2	C		0
Vppp3	C		0

Vppp4	C	0
Vhk1	C	0
Vg_12	D	
Vg_U	D	
Va	D	
Vsusyext	D	
Vfas2a	D	
Vfas2	D	
Vfum1	D	
Vwall	D	
Vsta	D	
Vglueff	D	
Vspeff	D	
Vsereff	D	
Vglyeff	D	
Vcheff	D	
Valaeff	D	
Varo1	D	
Vleueff	D	
Vthreff	D	
Vileeff	D	
Vvaleff	D	
Vpheeff	D	
Vtyreff	D	
Vproeff	D	
Vlyseff	D	
Vhiseff	D	

## EQUALITIES

NET

VALUE	FORMULA
	$0(4*Vg_{12})-Vg_U$
	$0Vfum1-Vfum2$
	$0Varo1-Varo2$
	$0Vfas2a-Vfas2b$

XCH

VALUE	FORMULA
	$0Vfum1-Vfum2$
	$0Varo1-Varo2$
	$0Vfas2a-Vfas2b$

## INEQUALITIES

NET

[mm]

VALUE	COMP	FORMULA
321.61	<=	Vg
15.29	<=	Va
0.89	<=	Vsta
51.38	<=	Vfas1
1.02	<=	Vpheeff
	230<=	Vwall
	1<=	Vfas2a
	1<=	Vfas2b
	0<=	Vfas1
	0<=	Vme
	0<=	Vhk1
	0<=	Vpdh
	0<=	Vpk
	0<=	Vppp1
	0<=	Vppp2
	0<=	Vppp3
	0<=	Vppp4
	0<=	Vsusy
	0<=	Vsusy2
347.13	>=	Vg
	10>=	Vaspeff
27.49	>=	Va
2.33	>=	Vsta
57.22	>=	Vfas1
1.46	>=	Vpheeff
	10>=	Vlyseff
	10>=	Vileeff
	10>=	Vleueff
	10>=	Valaeff
	10>=	Vvaleff
	10>=	Vtyreff
0.1	<=	Vlyseff
0.1	<=	Vileeff
0.1	<=	Vleueff
0.1	<=	Valaeff
0.1	<=	Vvaleff
0.1	<=	Vtyreff

XCH

VALUE	COMP	FORMULA
-------	------	---------

FLUX\_MEASUREMENTS

FLUX_NAME	VALUE	DEVIATION
-----------	-------	-----------

[nn]

Vg	334.37	12.76	
Va	21.39	6.1	
Vsta	1.61	0.72	
Vfas1	54.3		20
Vglueff	0.07	0.24	
Vsereff	3.87	0.09	
Vglyeff	7.19	0.19	
Vthreff	0.44	0.04	
Vpheeff	1.24	0.22	
Vproeff	1.4	0.04	
Vhiseff	4.88	0.01	

## LABEL\_INPUT

META\_NAME ISOTOPOMER VALUE

GLCext_U	#111111	0.9904
	#111110	0.0016
	#111101	0.0016
	#111011	0.0016
	#110111	0.0016
	#101111	0.0016
	#011111	0.0016
	GLCext_12	#110000
#100000		0.0016
#010000		0.0016
#111000		0.0016
#110100		0.0016
#110010		0.0016
#110001		0.0016
GLNext		#00000
	#10000	0.011
	#01000	0.011
	#00100	0.011
	#00010	0.011
	#00001	0.011

## LABEL\_MEASUREMENTS

META\_NAME CUM\_GROUP VALUE DEVIATION CUM\_CONSTRAINTS

## PEAK\_MEASUREMENTS

META\_NAME PEAK\_NO VALUE\_S VALUE\_D- VALUE\_D+

## MASS\_SPECTROMETRY

META_NAME	FRAGMENT	WEIGHT	VALUE	DEVIATION
STA	1,2,3,4,5,6		00.270630289215302	0.1
			10.0793959437752343	0.1
			20.297254067559615	0.1
			3	00.1
			4	00.1
			50.0000702423709093077	0.1
			60.35264945707894	0.1
GLC	1,2,3,4,5,6		00.06	0.1
			10.0311398401124909	0.1
			20.351138327825199	0.1
			30.00587009752798085	0.1
			40.0132292091809627	0.1
			50.0170524406577412	0.1
			60.581570084695625	0.1
Fruc	1,2,3,4,5,6		00.0513166788030201	0.1
			10.0238491727554525	0.1
			20.377356036411313	0.1
			3	00.1
			4	00.1
			50.000098129793848331	0.1
			60.547379982236366	0.1
SUCC	1,2,3,4		00.0792051967650883	0.01
			10.221102679728317	0.0375454203958124
			20.399004826972224	0.010214214531267
			30.190459294915332	0.0213463591673333
			40.110228001619038	0.01
FUM	1,2,3,4		00.0477010131176857	0.01
			10.244579581387058	0.0121582068147029
			20.300907195725604	0.01
			30.239751655306078	0.0220385249583599
			40.167060554463575	0.01
MAL	1,2,3,4		00.0388891570102003	0.0287752128567853
			10.257056982318571	0.01
			20.312179319249528	0.01
			30.254397633219828	0.0130175910413204
			40.137476908201873	0.01

CIT	1,2,3,4,5,6	00.0320348627533953	0.1
		10.251415071305889	0.1
		20.271797168419581	0.1
		30.195459840374978	0.1
		40.142440833698363	0.1
		50.0746830643736256	0.1
		60.0321691590741687	0.1
AcCoAp	1,2	00.688010092364817	0.1
		10.0716702926944124	0.1
		20.240319614940771	0.1
OPTIONS			
OPT_NAME	OPT_VALUE		

**Annexe 10 : Flux métaboliques en nmol.h<sup>-1</sup>.embryon<sup>-1</sup> correspondant à Astral.**

Nom	Astral Flux NET (nmol.h <sup>-1</sup> .embryon <sup>-1</sup> )			Astral Flux échange (nmol.h <sup>-1</sup> .embryon <sup>-1</sup> )	
	FCD	Moyenne	ecart type	Moyenne	ecart type
Vg	DepenDent	321,61	0,00	0,00	0,00
Va	Free	15,29	0,00	0,00	0,00
Vhk1	DepenDent	321,61	0,00	0,00	0,00

Vgf	DepenDent	91,61	0,91	0,00	0,00
Vald	DepenDent	91,61	0,91	0,00	5,48
Vglyco	Free	77,74	2,98	0,00	0,00
Vfas2a	DepenDent	29,12	1,71	0,84	1,91
Vfas2b	DepenDent	29,12	1,71	0,84	1,91
Vfas2	Free	58,25	3,43	0,00	0,00
Vpk	DepenDent	34,78	0,80	0,00	0,00
Vpyr	Free	34,68	0,80	0,00	0,00
Vgl	DepenDent	15,29	0,00	0,00	0,00
Vakg	DepenDent	13,01	0,19	0,00	0,00
Vpep	DepenDent	42,95	2,92	0,00	0,00
Vstsp	DepenDent	1,58	0,48	0,00	0,00
Valdp	DepenDent	-16,60	2,67	22,56	3,31
Vglycp	Free	11,79	2,88	10,31	7,46
Vpkp	Free	52,08	0,14	0,03	0,82
Vpdhp	DepenDent	51,48	0,14	0,07	0,33
Vfas1	Free	51,38	0,14	0,00	0,00
Vmep	Constraint	0,00	0,00	0,00	0,00
Vtcp	Free	47,23	1,99	40,62	6,51
Vppp1	Free	33,97	7,67	0,00	0,00
Vppp2	DepenDent	10,14	2,57	0,00	0,00
Vppp3	DepenDent	10,14	2,57	0,00	0,00
Vppp4	DepenDent	8,81	2,54	0,00	0,00
Vpdh	DepenDent	47,06	0,92	0,00	0,00
Vcs	DepenDent	47,06	0,92	252,13	5,11
Vca	DepenDent	47,06	0,92	232,12	4,74
Viso	DepenDent	47,06	0,92	232,12	4,74
Vsfa	DepenDent	60,07	1,07	60,82	9,13
Vfum1	DepenDent	30,03	0,53	39,44	7,52
Vfum2	DepenDent	30,03	0,53	39,44	7,52
Vfum	DepenDent	60,07	1,07	0,00	0,00
Vmdh	Free	60,07	1,07	0,00	0,00
Vme	DepenDent	12,38	0,20	0,00	0,00
Vwall	Free	230,00	0,91	0,00	0,00
Vsta	Free	1,58	0,48	0,00	0,00
Vglueff	Free	0,86	0,19	0,00	0,00
Vasp	DepenDent	0,53	0,04	0,07	0,08
Vaspeff	Free	0,00	0,00	0,00	0,00
Vser	DepenDent	11,06	0,22	22,82	3,95
Vsereff	Free	3,87	0,08	0,00	0,00
Vgly	DepenDent	7,19	0,20	22,82	3,95
Vglyeff	DepenDent	7,19	0,20	0,00	0,00
Vcheff	Free	2,31	0,20	0,00	0,00

Vala	DepenDent	0,10	0,01	0,00	0,00
Valaeff	Free	0,10	0,01	0,00	0,00
Varo1	DepenDent	0,67	0,07	18,27	9,38
Varo2	DepenDent	0,67	0,07	18,27	9,38
Vleu1	DepenDent	0,10	0,00	0,07	0,36
Vleu	DepenDent	0,10	0,00	0,02	0,16
Vleueff	DepenDent	0,10	0,00	0,00	0,00
Vthr	DepenDent	0,53	0,04	0,00	0,00
Vthreff	Free	0,43	0,04	0,00	0,00
Vile	DepenDent	0,10	0,00	0,07	0,33
Vileeff	Free	0,10	0,00	0,00	0,00
Vval	DepenDent	0,10	0,00	0,07	0,33
Vvaleff	Free	0,10	0,00	0,00	0,00
Vphe	DepenDent	1,23	0,14	2,87	4,16
Vpheeff	DepenDent	1,23	0,14	0,00	0,00
Vtyr	DepenDent	0,10	0,00	2,87	4,16
Vtyreff	Free	0,10	0,00	0,00	0,00
Vpro	DepenDent	1,42	0,04	0,00	0,00
Vproeff	DepenDent	1,42	0,04	0,00	0,00
Vlys	DepenDent	0,10	0,00	0,07	0,33
Vlyseff	Free	0,10	0,00	0,00	0,00
Vhis	DepenDent	4,88	0,01	0,00	0,00
Vhiseff	DepenDent	4,88	0,01	0,00	0,00

**Annexe 11 : Fichier ftbl correspondant à 238.**

PROJECT

NAME	VERSION	FORMAT	DATE	COMMENT
Lin				

NETWORK

FLUX_NAME	EDUCT_1	EDUCT_2	PRODUCT_1	PRODUCT_2
Vg_12	GLCext_12 #ABCDEF		GLCext #ABCDEF	
Vg_U	GLCext_U #ABCDEF		GLCext #ABCDEF	
Vg	GLCext #ABCDEF		GLC #ABCDEF	

Va	GLNext #ABCDE		GLN #ABCDE	
Vhk1	GLC #ABCDEF		G6P #ABCDEF	
Vgf	G6P #ABCDEF		F6P #ABCDEF	
Vsusy	GLC #ABCDEF	Fruc #abcdef	Suc #ABCDEFabcdef	
Vsusyext	Suc #ABCDEFabcdef		Suc_Aux #ABCDEFabcdef	
Vsusy2	F6P #ABCDEF		Fruc #ABCDEF	
Vald	F6P #ABCDEF		TP #CBA	TP #DEF
Vglyco	TP #ABC		PEP #ABC	
Vfas2a	TP #ABC		G3P #ABC	
Vfas2b	TP #ABC		G3P #CBA	
Vfas2	G3P #ABC		G3P_Aux #ABC	
Vpk	PEP #ABC		PYRc #ABC	
Vpyr	PYRc #ABC		PYRm #ABC	
Vgl	GLN #ABCDE		GLU #ABCDE	
Vakg	GLU #ABCDE		AKG #ABCDE	

Vpep	PEP #ABC		PEPp #ABC	
Vstsp	H6Pp #ABCDEF		STA #ABCDEF	
Valdp	H6Pp #ABCDEF		TPp #CBA	TPp #DEF
Vglycp	TPp #ABC		PEPp #ABC	
Vpkp	PEPp #ABC		PYRp #ABC	
Vpdhp	PYRp #ABC		CO2 #A	AcCoAp #BC
Vfas1	AcCoAp #AB		AcCoAp_Aux #AB	
Vmep	MAL #ABCD		PYRp #ABC	CO2 #D
Vtcp	TP #ABC		TPp #ABC	
Vppp1	H6Pp #ABCDEF		CO2 #A	P5Pp #BCDEF
Vppp2	P5Pp #ABCDE	P5Pp #abcde	S7Pp #ABabcde	TPp #CDE
Vppp3	TPp #ABC	S7Pp #abcdefg	E4Pp #defg	H6Pp #abcABC
Vppp4	P5Pp #ABCDE	E4Pp #abcd	TPp #CDE	H6Pp #ABabcd
Vpdh	PYRm #ABC		CO2 #A	AcCoA #BC
Vcs	AcCoA	OAA	CIT	

	#AB	#abcd	#ABabcd	
Vca	CIT #ABCDEF		ICIT #ABCDEF	
Viso	ICIT #ABCDEF		CO2 #C	AKG #FEDBA
Vsfa	AKG #ABCDE		CO2 #A	SUCC #BCDE
Vfum1	SUCC #ABCD		FUM #ABCD	
Vfum2	SUCC #ABCD		FUM #DCBA	
Vfum	FUM #ABCD		MAL #ABCD	
Vmdh	MAL #ABCD		OAA #ABCD	
Vme	OAA #ABCD		CO2 #D	PYRm #ABC
Vwall	G6P #ABCDEF		G6P_Aux #ABCDEF	
Vsta	STA #ABCDEF		STA_Aux #ABCDEF	
Vglueff	GLU #ABCDE		GLU_Aux #ABCDE	
Vasp	OAA #ABCD		ASP #ABCD	
Vaspeff	ASP #ABCD		ASP_Aux #ABCD	
Vser	TPp #ABC		SER #ABC	

Vsereff	SER #ABC		SER_Aux #ABC	
Vgly	SER #ABC		GLY #AB	CH4 #C
Vglyeff	GLY #AB		GLY_Aux #AB	
Vcheff	CH4 #A		CH4_Aux #A	
Vala	PYRc #ABC		ALA #ABC	
Valaeff	ALA #ABC		ALA_Aux #ABC	
Varo1	E4Pp #ABCD	PEPp #abc	ARO #abcABCD	
Varo2	E4Pp #ABCD	PEPp #abc	ARO #abDCBAc	
Vleu1	PYRp #ABC	PYRp #abc	LEU1 #abcBC	CO2 #A
Vleu	LEU1 #ABCDE	AcCoAp #ab	LEU #abBDEC	CO2 #A
Vleueff	LEU #ABCDEF		LEU_Aux #ABCDEF	
Vthr	ASP #ABCD		THR #ABCD	
Vthreff	THR #ABCD		THR_Aux #ABCD	
Vile	PYRp #ABC	THR #abcd	ILE #abBcdC	CO2 #A
Vileeff	ILE #ABCDEF		ILE_Aux #ABCDEF	

Vval	PYRp #ABC	PYRp #abc	VAL #abBcC	CO2 #A
Vvaleff	VAL #ABCDE		VAL_Aux #ABCDE	
Vphe	ARO #ABCDEFG	PEPp #abc	PHE #abcBCDEFG	CO2 #A
Vpheeff	PHE #ABCDEFGHI		PHE_Aux #ABCDEFGHI	
Vtyr	ARO #ABCDEFG	PEPp #abc	TYR #abcBCDEFG	CO2 #A
Vtyreff	TYR #ABCDEFGHI		TYR_Aux #ABCDEFGHI	
Vpro	GLU #ABCDE		PRO #ABCDE	
Vproeff	PRO #ABCDE		PRO_Aux #ABCDE	
Vlys	OAA #ABCD	PYRp #abc	LYS #ABCDbc	CO2 #a
Vlyseff	LYS #ABCDEF		LYS_Aux #ABCDEF	
Vhis	P5Pp #ABCDE	CH4 #a	HIS #aEDCBA	
Vhiseff	HIS #ABCDEF		HIS_Aux #ABCDEF	

## FLUXES

NET

NAME	FCD	VALUE(F/C)	ED_WEIGHT
Vg_U	F	274.1645869925912	
Vglyco	F	604.2924873569436	
Vfas2	F		2

---

Vpep	F	342.7064804834902
Vglycp	F	-2279.853953768644
Vpkp	F	51.38
Vfas1	F	51.38
Vtcp	F	-606.2939808424459
Vppp1	F	1173.749710352265
Vme	F	0
Vwall	F	0
Vsta	F	1.300187500549748
Vglueff	F	0.06823505166536055
Vaspeff	F	617.6745171125933
Vsereff	F	3.866648271571579
Vglyeff	F	7.175063635464591
Vcheff	F	2.295190746751014
Valaeff	F	0
Vthreff	F	0.4397834190359928
Vileeff	F	0
Vvaleff	F	0
Vpheeff	F	1.084286859743333
Vproeff	F	1.399951773650395
Vlyseff	F	0
Vmep	F	0.01
Vg_12	D	
Vg	D	
Va	D	
Vhk1	D	
Vgf	D	
Vsusy	D	
Vsusyext	D	
Vsusy2	D	
Vald	D	
Vfas2a	D	
Vfas2b	D	
Vpk	D	
Vpyr	D	
Vgl	D	
Vakg	D	
Vstsp	D	
Valdp	D	
Vpdhp	D	
Vppp2	D	
Vppp3	D	
Vppp4	D	
Vpdh	D	

Vcs	D
Vca	D
Viso	D
Vsfa	D
Vfum1	D
Vfum2	D
Vfum	D
Vmdh	D
Vasp	D
Vser	D
Vgly	D
Vala	D
Varo1	D
Varo2	D
Vleu1	D
Vleu	D
Vleueff	D
Vthr	D
Vile	D
Vval	D
Vphe	D
Vtyr	D
Vtyreff	D
Vpro	D
Vlys	D
Vhis	D
Vhiseff	D

XCH

NAME	FCD	VALUE(F/C)	ED_WEIGHT
Vgf	F	0.00406920751744582	
Vsusy	F	0.49208759030184	
Vsusy2	F	0.00680326214204739	
Vald	F		0
Vglyco	F	0.999	
Vfas2b	F	0.999	
Vpyr	F	0.197960023041109	
Vgl	F	0.000140480109234973	
Vakg	F	0.999	
Vpep	C		0
Vstsp	F	0.00101763991754786	
Valdp	F		0
Vglycp	F		0

---

Vpkp	F	0.999
Vpdhp	F	0.998438491879408
Vtcp	F	0
Vcs	F	0.999
Vca	F	0.999
Viso	F	0.999
Vsfa	F	0.999
Vfum2	F	0.9059733789867
Vfum	F	0.998835925792536
Vmdh	F	0.951692821180632
Vasp	F	0.00529194436342665
Vser	F	0.999
Vgly	F	0.999
Vala	F	0.349682437337116
Varo2	F	0
Vleu1	F	0.000221948058013966
Vleu	F	0.00028578406624833
Vthr	F	0
Vile	F	0.998438556787477
Vval	F	0.000273827071147864
Vphe	F	0.213673805045895
Vtyr	F	0.0000115070261943132
Vpro	F	0
Vlys	F	0.998438444547177
Vhis	F	0.0000937275912298077
Vg	C	0
Vfas1	C	0
Vme	C	0
Vmep	C	0
Vpdh	C	0
Vpk	F	0.01
Vppp1	C	0
Vppp2	C	0
Vppp3	C	0
Vppp4	C	0
Vhk1	F	0.01
Vg_12	D	
Vg_U	D	
Va	D	
Vsusyext	D	
Vfas2a	D	
Vfas2	D	
Vfum1	D	
Vwall	D	

Vsta	D
Vglueff	D
Vaspeff	D
Vsereff	D
Vglyeff	D
Vcheff	D
Valaeff	D
Varo1	D
Vleueff	D
Vthreff	D
Vileeff	D
Vvaleff	D
Vpheeff	D
Vtyreff	D
Vproeff	D
Vlyseff	D
Vhiseff	D

## EQUALITIES

## NET

VALUE	FORMULA
	0(4*Vg_12)-Vg_U
	0Vfum1-Vfum2
	0Varo1-Varo2
	0Vfas2a-Vfas2b

## XCH

VALUE	FORMULA
	0Vfum1-Vfum2
	0Varo1-Varo2
	0Vfas2a-Vfas2b

## INEQUALITIES

## NET

VALUE	COMP	FORMULA
340.56	<=	Vg
23.07	<=	Va
2.51	<=	Vsta
	230<=	Vwall
	1<=	Vfas2a
	1<=	Vfas2b
	0<=	Vfas1
	0<=	Vme
	0<=	Vhk1

[bbb]

	0<=	Vpdh
	0<=	Vpk
	0<=	Vppp1
	0<=	Vppp2
	0<=	Vppp3
	0<=	Vppp4
	0<=	Vsusy
	0<=	Vsusy2
	10>=	Vaspeff
	10>=	Vlyseff
	10>=	Vileeff
	10>=	Vleueff
	10>=	Valaeff
	10>=	Vvaleff
	10>=	Vtyreff
422.34	>=	Vg
27.35	>=	Va
4.41	>=	Vsta
0.1	<=	Vaspeff
0.1	<=	Vlyseff
0.1	<=	Vileeff
0.1	<=	Vleueff
0.1	<=	Valaeff
0.1	<=	Vvaleff
0.1	<=	Vtyreff

XCH

VALUE	COMP	FORMULA
-------	------	---------

## FLUX\_MEASUREMENTS

FLUX_NAME	VALUE	DEVIATION
Vg	381.4534364007	40.89
Va	25.21	2.14
Vsta	3.4562438988	0.9484515294
Vfas1	49.6610184609	0.5038938551
Vglueff	1.2127898479	0.023022383
Vsereff	4.5234463294	0.0126558724
Vglyeff	1.7311124669	0.2702556161
Vthreff	0.5294166997	0.0113763596
Vpheeff	0.6511742063	0.0142620236
Vproeff	1.0782857474	0.0212679142
Vhiseff	5.0444826389	0.0793972756

## LABEL\_INPUT

META_NAME	ISOTOPOMER	VALUE
GLCext_U	#111111	0.9904
	#111110	0.0016
	#111101	0.0016
	#111011	0.0016
	#110111	0.0016
	#101111	0.0016
	#011111	0.0016
GLCext_12	#110000	0.9904
	#100000	0.0016
	#010000	0.0016
	#111000	0.0016
	#110100	0.0016
	#110010	0.0016
	#110001	0.0016
GLNext	#00000	0.945
	#10000	0.011
	#01000	0.011
	#00100	0.011
	#00010	0.011
	#00001	0.011

## LABEL\_MEASUREMENTS

META_NAME	CUM_GROUP	VALUE	DEVIATION	CUM_CONSTRAINTS
-----------	-----------	-------	-----------	-----------------

## PEAK\_MEASUREMENTS

META_NAME	PEAK_NO	VALUE_S	VALUE_D-	VALUE_D+
-----------	---------	---------	----------	----------

## MASS\_SPECTROMETRY

META_NAME	FRAGMENT	WEIGHT	VALUE	DEVIATION
STA	1,2,3,4,5,6		00.6575895739	0.200228744
			10.0088630543	0.01
			20.0615470134	0.0442483749
			30.0236960385	0.0129539011
			40.0224947535	0.01
			50.0551391786	0.043586199
GLC	1,2,3,4,5,6		60.1706703878	0.1415501165
			0	00.01
			10.0103219842	0.01
			20.1799184981	0.021757801
		30.0097767965	0.0138264783	

[ddd]

			4	00.01
			5	00.01
			60.7999827212	0.01
Fruc	1,2,3,4,5,6		00.0173533545	0.01
			10.0088524725	0.01
			20.1012546616	0.01
			30.0560954603	0.01
			40.0485137997	0.01
			50.1542093889	0.033122052
			60.6137208625	0.0240101115
SUCC	1,2,3,4		00.0622338129	0.01
			10.0423883362	0.0537109581
			20.3531026768	0.0350569612
			30.2143427854	0.0180753539
			40.3279323888	0.0211556037
FUM	1,2,3,4		00.0262046046	0.01
			10.0149867222	0.01
			20.2329668809	0.0124723995
			30.3203993747	0.01
			40.4054424175	0.0143993697
MAL	1,2,3,4		00.0303812206	0.01
			10.0158590228	0.01
			20.2393231827	0.0154426715
			30.3351842911	0.01
			40.3792522828	0.0153840451
CIT	1,2,3,4,5,6		00.0194028317	0.01
			10.0220422817	0.01
			20.1872468456	0.01
			30.1937974803	0.01
			40.2112644374	0.01
			50.1906707464	0.01
			60.1755753769	0.01
AcCoAp		1,2	00.5038954242	0.1
			10.0548691537	0.1
			20.4412354221	0.1

## OPTIONS

OPT\_NAME OPT\_VALUE

**Annexe 12 : Flux métaboliques en  $\text{nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$  correspondant à 238.**

NAME	Flux net 238 ( $\text{nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ )			Flux d'échange 238 ( $\text{nmol.h}^{-1}.\text{embryon}^{-1}$ ).	
	FCD	Moyenne	ecart type	Moyenne	ecart type
Vg_12	DepenDent	68,11	0,00	0,00	0,00
Vg_U	Free	272,45	0,00	0,00	0,00
Vg	DepenDent	340,56	0,00	0,00	0,00
Va	Free	23,07	0,00	0,00	0,00
Vhk1	DepenDent	340,56	0,35	0,00	0,00
Vgf	DepenDent	106,35	1,67	0,00	0,00
Vald	DepenDent	106,35	1,62	91,93	8,90
Vglyco	Free	130,73	4,15	0,00	0,02
Vfas2a	DepenDent	1,00	0,30	1,39	5,19
Vfas2b	DepenDent	1,00	0,30	1,39	5,19
Vfas2	Free	2,00	0,60	0,00	0,00
Vpk	DepenDent	124,87	2,76	0,00	0,00

Vpyr	Free	124,77	2,76	0,00	0,00
Vgl	DepenDent	23,07	0,00	0,00	0,00
Vakg	DepenDent	20,78	0,04	0,00	0,00
Vpep	DepenDent	5,86	3,87	0,00	0,00
Vstsp	DepenDent	3,10	0,72	0,00	0,00
Valdp	DepenDent	-16,09	1,89	0,00	0,84
Vglycp	Free	45,94	3,88	0,00	0,86
Vpkp	Free	50,30	0,52	0,00	0,00
Vpdhp	DepenDent	49,70	0,52	0,01	0,00
Vfas1	Free	49,60	0,52	0,00	0,00
Vmep	Constraint	0,00	0,00	0,00	0,00
Vtcp	Free	79,97	4,55	24,51	16,32
Vppp1	Free	28,66	5,04	0,00	0,00
Vppp2	DepenDent	8,21	1,68	0,00	0,00
Vppp3	DepenDent	8,21	1,68	0,00	0,00
Vppp4	DepenDent	7,46	1,68	0,00	0,00
Vpdh	DepenDent	144,72	2,76	0,00	0,00
Vcs	DepenDent	144,72	2,76	0,00	2,25
Vca	DepenDent	144,72	2,76	0,00	5,87
Viso	DepenDent	144,72	2,76	0,00	5,87
Vsfa	DepenDent	165,49	2,76	0,00	0,00
Vfum1	DepenDent	82,75	1,38	0,00	0,00
Vfum2	DepenDent	82,75	1,38	0,00	0,00
Vfum	DepenDent	165,49	2,76	0,00	0,00
Vmdh	Free	165,49	2,76	0,00	0,00
Vme	DepenDent	19,95	0,03	0,00	0,00
Vwall	Free	234,21	1,79	0,00	0,00
Vsta	Free	3,10	0,72	0,00	0,00
Vglueff	Free	1,21	0,02	0,00	0,00
Vasp	DepenDent	0,73	0,01	0,00	0,00
Vaspeff	Free	0,10	0,00	0,00	0,00
Vser	DepenDent	9,30	0,09	18,13	13,80
Vsereff	Free	4,52	0,01	0,00	0,00
Vgly	DepenDent	4,78	0,09	18,13	13,80
Vglyeff	DepenDent	4,78	0,09	0,00	0,00
Vcheff	Free	0,00	0,00	0,00	0,00
Vala	DepenDent	0,10	0,00	0,00	0,00
Valaeff	Free	0,10	0,00	0,00	0,00
Varo1	DepenDent	0,38	0,01	0,00	0,78
Varo2	DepenDent	0,38	0,01	0,00	0,78
Vleu1	DepenDent	0,10	0,00	0,01	0,00
Vleu	DepenDent	0,10	0,00	0,00	0,00

---

Vleueff	DepenDent	0,10	0,00	0,00	0,00
Vthr	DepenDent	0,63	0,01	0,00	0,00
Vthreff	Free	0,53	0,01	0,00	0,00
Vile	DepenDent	0,10	0,00	0,01	0,00
Vileeff	Free	0,10	0,00	0,00	0,00
Vval	DepenDent	0,10	0,00	0,01	0,00
Vvaleff	Free	0,10	0,00	0,00	0,00
Vphe	DepenDent	0,65	0,02	0,00	0,00
Vpheeff	DepenDent	0,65	0,02	0,00	0,00
Vtyr	DepenDent	0,10	0,00	0,00	0,00
Vtyreff	Free	0,10	0,00	0,00	0,00
Vpro	DepenDent	1,08	0,03	0,00	0,00
Vproeff	DepenDent	1,08	0,03	0,00	0,00
Vlys	DepenDent	0,10	0,00	0,01	0,00
Vlyseff	Free	0,10	0,00	0,00	0,00
Vhis	DepenDent	4,78	0,09	0,00	0,00
Vhiseff	DepenDent	4,78	0,09	0,00	0,00

**TABLE DES FIGURES**

Figure 1 : Les utilisations du lin textile et du lin oléagineux d'après Czemplik <i>et al.</i> , 2011.....	6
Figure 2 : Répartition des débouchés des graines de lin (d'après Labalette <i>et al.</i> , 2011 - Onidol/Cetiom 2010).....	7
Figure 3 : Estimation du progrès génétique sur le facteur de rendement de production (Labalette <i>et al.</i> , 2011 - Onidol/Cetiom 2010). ....	9
Figure 4 : Planche botanique du lin cultivé ( <i>Linum Usitatissimum</i> ), domaine public. ....	10
Figure 5 : Développement des embryons des graines de lin d'après Venglat <i>et al.</i> , 2011.....	11
Figure 6 : Structure de la graine de lin ( <i>L. usitatissimum</i> ).....	13
Figure 7 : Mucilage des graines de lin détecté par coloration au rouge de ruthénium (colorant les pectines) d'après (Naran <i>et al.</i> , 2008). ....	18
Figure 8 : Immunolocalisation subcellulaire des lignanes dans différentes sections transversales de graines de lin : Observations faites en microscopie électronique à transmission, d'après Attoumbré <i>et al.</i> , 2010. ....	23
Figure 9 : Schéma simplifié du métabolisme central dans les graines oléagineuses durant la phase de maturation d'après Baud et Lepiniec, 2010. ....	24
Figure 10 : Modèle montrant les domaines symplastiques dans la graine d' <i>Arabidopsis thaliana</i> et les voies nutritionnelles dans la graine au cours du développement de l'embryon d'après Stadler <i>et al.</i> , 2005. ....	26
Figure 11 : Flux métabolique dans les embryons de maïs d'après Alonso <i>et al.</i> , 2010. ....	28
Figure 12 : Schéma du métabolisme du carbone central dans le développement des embryons de <i>B. napus</i> lors d'une accumulation d'huile d'après Schwender <i>et al.</i> , 2003. ....	30
Figure 13 : Métabolisme carboné durant le développement des graines de lin d'après Barvkar <i>et al.</i> , 2012. ....	31
Figure 14 : Schéma des réactions permettant la synthèse des acides gras et la formation des triglycérides dans les graines oléagineuses (Baud et Lepiniec, 2010). ....	35
Figure 15 : Réactions permettant la synthèse des triglycérides d'après Bates <i>et al.</i> , 2012. ...	41
Figure 16 : Voie de synthèse de l'amidon, d'après Buchanan <i>et al.</i> , 2000 .....	44
Figure 17 : Structure d'un rhamnogalacturonane de type I présentant des ramifications composées de sucres neutres (Combo <i>et al.</i> , 2011). ....	45
Figure 18 : Modèle de régulation de la synthèse du mucilage chez <i>A. thaliana</i> (Shi <i>et al.</i> , 2012).....	47
Figure 19 : Représentation des voies de synthèse des famille d'acides aminés (Buchanan <i>et al.</i> , 2000).....	48
Figure 20 : Voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et des monolignols d'après Buchanan <i>et al.</i> , 2000.....	53
Figure 21 : Biosynthèse des lignanes chez le lin cultivé ( <i>Linum usitatissimum</i> ) d'après Lamblin <i>et al.</i> , 2008.....	55
Figure 22 : Teneur en SDG dans les graines de lin au cours de leur développement d'après Fang <i>et al.</i> , 2013. ....	56

Figure 23 : Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes dans les graines d' <i>Arabidopsis thaliana</i> d'après Routaboul <i>et al.</i> , 2006.....	57
Figure 24 : Contrôle de l'accumulation des composés de réserves dans les graines d' <i>Arabidopsis thaliana</i> au cours de la phase de maturation des graines d'après Santos-Mendoza <i>et al.</i> , 2008.....	61
Figure 25 : Différence du flux de carbone dans les embryons du mutant <i>wri1</i> et du témoin d' <i>Arabidopsis thaliana</i> d'après Lonien et Schwender, 2009.....	64
Figure 26 : Différence du flux de carbone dans les embryons du double mutant <i>pkpb1/pkpa</i> et du témoin d' <i>Arabidopsis thaliana</i> d'après Lonien et Schwender, 2009.....	65
Figure 27 : Fonctions métaboliques putatives des gènes cibles sur-exprimés par <i>ZmWRI1a</i> (Maïs) et <i>AtWRI1</i> ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) d'après Pouvreau <i>et al.</i> , 2011.....	66
Figure 28 : Nombre d'ESTs codant pour des facteurs putatifs de transcription connus comme des régulateurs d'embryogenèse (Venglat <i>et al.</i> , 2011).....	69
Figure 29 : Carte comparative des flux métaboliques représentant le métabolisme du carbone central dans les cotylédons de soja cultivés sous deux températures différentes d'après Iyer <i>et al.</i> , 2008.....	75
Figure 30 : Voies métaboliques liées à la biosynthèse des acides gras dans les embryons de lin d'après Klubicová <i>et al.</i> , 2013. ....	76
Figure 31 : Teneur en huile et profil en acides gras des deux lignées de lin sélectionnées .....	79
Figure 32 : Principe et méthodologie des puces à ADN .....	93
Figure 33 : Principe général de l'expérience de marquage isotopique utilisé pour le calcul des flux métaboliques, adapté de Schwender, 2011.....	99
Figure 34 : Définition des flux nets et des flux d'échange d'après Wiechert <i>et al.</i> , 2001.....	109
Figure 35 : Photographie des deux lignées de lin au cours de la floraison.....	113
Figure 36 : Caractères phénotypiques et physiologiques des deux lignées de lin.....	114
Figure 37 : Caractères phénotypiques des graines des deux lignées de lin.....	115
Figure 38 : Caractérisation biochimique des graines matures de lin.....	116
Figure 39 : Profil en acides gras dans les graines matures d' <i>Astral</i> et <i>238</i> .....	117
Figure 40 : Teneur en sucres libres dans les graines de lin .....	119
Figure 41 : Teneur en proanthocyanidines en g d'équivalent de catéchine pour 100 g MS. L'analyse statistique a été effectuée sur 3 répétitions biologiques. Les cultures de ces plantes ont été effectuées entre le 15 octobre 2011 et le 30 janvier 2014. MS : Matière sèche. ML : Matière lyophilisée. EC : Ecart type. $p > 0.05$ : NS ; $p < 0.05$ : * ; $p < 0.01$ : ** ; $p < 0.001$ : ***.	122
Figure 42 : Teneur en huile dans les différentes lignées de lin au cours du développement. ....	123
Figure 43 : Accumulation des acides gras (%) dans les graines de lin <i>Astral</i> et <i>238</i> .....	124
Figure 44 : Evolution de la couleur du tégument et des embryons chez les graines de la lignée <i>Astral</i> de 18 JAF à graine mature. ....	125
Figure 45 : Evolution de la couleur du tégument et de l'embryon chez les graines de la.....	126
Figure 46 : Proportion d'embryons et de téguments dans les graines de lin matures .....	127

Figure 47 : Répartition des composés de réserves dans les graines de lin, dans les embryons et les téguments.....	128
Figure 48 : Evolution de la quantité d'huile au cours du développement de la graine. ....	130
Figure 49 : Teneurs en acides gras dans les embryons et les téguments de lin. ....	131
Figure 50 : Accumulation des protéines au cours de l'embryogenèse. ....	132
Figure 51 : Evolution de la teneur en acides aminés dans les embryons de lin. ....	133
Figure 52 : Evolution de la teneur en amidon dans les embryons de lin. ....	136
Figure 53 : Evolution de la quantité de polyphénols dans les graines de lin. ....	136
Figure 54 : Différences d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des proanthocyanidines dans les téguments de lin <i>Astral</i> et 238 à 24 JAF.....	150
Figure 55 : Différence d'expression des ESTs codant pour des enzymes du métabolisme carboné dans les embryons de lin <i>Astral</i> et 238 âgés de 24 JAF. ....	162
Figure 56 : Teneur en matière sèche (MS), en huile, en protéines et amidon dans les embryons âgés de 16 JAF incubés durant 24, 72, 120, 128 heures (embryons incubés), et dans les embryons âgés de 17, 19, 21 et 23 JAF (embryons <i>in planta</i> ). ....	175
Figure 57 : Condition des composés à l'état stationnaire métabolique, d'après Dieuaide-Noubhani <i>et al.</i> , (2004). ....	176
Figure 58 : Evolution de la teneur en substrats, intermédiaires métaboliques et produits entre 0 et 168 heures d'incubation.....	176
Figure 59 : Obtention du fragment de Mc Lafferty après fragmentation des esters méthyliques d'acides gras. ....	179
Figure 60 : Chromatogrammes et spectres de masse de standards d'esters méthyliques d'acides gras. ....	180
Figure 61 : Chromatogrammes et spectres de masse de la fraction soluble contenant les sucres libres.....	182
Figure 62 : Chromatogrammes et spectres de masse de la fraction soluble contenant les acides organiques.....	186
Figure 63 : Chromatogrammes et spectres de masse de standards d'acides aminés. ....	189
Figure 64 : Evolution des enrichissements moyen en $^{13}\text{C}$ des différents métabolites durant 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation. ....	193
Figure 65 : Modèle utilisé pour l'analyse des flux métaboliques dans les embryons de lin, rédigé au format FTBL. ....	198
Figure 66 : Représentation schématique des échanges entre les hexoses, hexoses phosphates, saccharose et triose phosphate dans le métabolisme de l'embryon de lin au cours des expériences $^{13}\text{C}$ -étiquetage (Troufflard <i>et al.</i> , 2007).....	201
Figure 67 : Flux métaboliques ( $\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{embryon}^{-1}$ ) dans les embryons de la lignée <i>Astral</i> . 213	
Figure 68 : Flux métaboliques ( $\text{nmol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{embryon}^{-1}$ ) dans les embryons de la lignée 238. ...	226
Figure 69 : Différence d'expression des gènes, des flux métaboliques et des analyses biochimiques dans les embryons de lin <i>Astral</i> par rapport aux embryons de lin 238.....	238

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau I : Composition en acides gras de l'huile de lin (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2010 ; Daun <i>et al.</i> , 2003).....	14
Tableau II : Composition en acides aminés des graines de lin et de soja, d'après Morris, 2007. ....	17
Tableau III : Structure des principaux acides phénoliques.....	20
Tableau IV : Teneurs des différents flavonoïdes dans les graines de lin d'après Zuk <i>et al.</i> , 2011 ; Zuk <i>et al.</i> , 2012 ; Fliniaux <i>et al.</i> , 2014.....	21
Tableau V : Gènes altérant la production de proanthocyanidines dans les graines d' <i>Arabidopsis thaliana</i> d'après Lepiniec <i>et al.</i> , 2006. ....	58
Tableau VI : Gradient d'élution utilisé pour séparer les acides aminés Temps (minute) .....	85
Tableau VII : Méthode MRM utilisée pour quantifier les acides aminés.....	86
Tableau VIII : Gradient d'élution pour séparer les polyphénols .....	91
Tableau IX : Teneurs des composés phénoliques dans les graines matures de lin <i>Astral</i> et <i>238</i> . ....	121
Tableau X : Teneurs des composés phénoliques dans les embryons de graines matures des lignées <i>Astral</i> et <i>238</i> exprimées en mg/100g de MS. ....	137
Tableau XI : Teneurs des composés phénoliques dans les téguments de graines de lin matures des lignées <i>Astral</i> et <i>238</i> exprimées en mg pour 100g téguments .....	138
Tableau XII : Nombre de gènes différentiellement exprimés entre les lignées <i>Astral</i> et <i>238</i> dans les téguments et les embryons à 16 JAF, 24 JAF, 32 JAF et 38 JAF. ....	142
Tableau XIII : Différence d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi cellulaire dans les téguments de lin <i>Astral</i> et <i>238</i> à 24 JAF .....	144
Tableau XIV : Différence d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des proanthocyanidines dans les téguments de lin <i>Astral</i> et <i>238</i> à 24 JAF.....	149
Tableau XV : Différence d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme carboné et des facteurs de transcription dans les téguments de lin <i>Astral</i> et <i>238</i> à 24 JAF .....	151
Tableau XVI : Différence d'expression des gènes codant pour les facteurs de transcription LEC1, LEC2, WRI1, DOF, ABI3, FUS3, GL2, FIE, PHE, MINI3, IKU2 dans les téguments de lin <i>Astral</i> et <i>238</i> à 24 JAF .....	154
Tableau XVII : Différence d'expression des gènes codant pour des transporteurs dans les embryons de lin <i>Astral</i> et <i>238</i> à 24 JAF .....	156
Tableau XVIII : Différence d'expression des gènes codant pour des protéines de stockages dans les embryons de lin <i>Astral</i> et <i>238</i> à 24 JAF .....	158
Tableau XIX : Différence d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme carboné dans les embryons de lin <i>Astral</i> et <i>238</i> à 24 JAF .....	161
Tableau XX : Différence d'expression des gènes codant pour des enzymes de la synthèse de novo dans les embryons de lin <i>Astral</i> et <i>238</i> à 24 JAF .....	168
Tableau XXI : Différence d'expression des gènes codant pour des facteurs de transcription dans les embryons de lin <i>Astral</i> et <i>238</i> à 24 JAF. ....	170

Tableau XXII : Vitesse de consommation du glucose et de la glutamine après incubation des embryons de soja, de tournesol, de maïs. ....	178
Tableau XXIII : Evolution des enrichissements en $^{13}\text{C}$ des deux derniers carbones de l'acide palmitique (C16:0) et de l'acide stéarique (C18:0) durant 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation.....	181
Tableau XXIV : Evolution des enrichissements en $^{13}\text{C}$ du M-H <sup>+</sup> du glucose et du fructose durant 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation. ....	183
Tableau XXV : Evolution des enrichissements en $^{13}\text{C}$ du M-H <sup>+</sup> du saccharose durant 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation. ....	184
Tableau XXVI : Evolution des enrichissements en $^{13}\text{C}$ du M-H <sup>+</sup> des acides organiques durant 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation. ....	187
Tableau XXVII : Evolution des enrichissements en $^{13}\text{C}$ du M+H <sup>+</sup> de la proline, et de l'arginine durant 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation. ....	190
Tableau XXVIII : Evolution des enrichissements en $^{13}\text{C}$ du M+H <sup>+</sup> de la lysine, de l'asparagine et de la valine durant 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation. ....	191
Tableau XXIX : Evolution des enrichissements en $^{13}\text{C}$ du glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon durant 24, 72, 120 et 168 heures d'incubation. ....	192
Tableau XXX : Enrichissements isotopiques des sucres libres après culture d'embryons de lin ( <i>Astral</i> ) âgés de 16 JAF en présence de 20 % de [1- $^{13}\text{C}_1$ ]-glucose. ....	200
Tableau XXXI : Enrichissements isotopiques du glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon après culture d'embryons de lin ( <i>Astral</i> ) âgés de 16 JAF en présence de 20 % de [1- $^{13}\text{C}_1$ ]-glucose.....	202
Tableau XXXII : Enrichissements isotopiques des acides organiques et du fragment de Mc lafferty de l'acide palmitique après culture d'embryons de lin ( <i>Astral</i> ) âgés de 16 JAF avec 20 % de [1- $^{13}\text{C}_1$ ]-glucose. ....	203
Tableau XXXIII : Enrichissements isotopiques des acides organiques et du fragment de Mc lafferty de l'acide palmitique après culture d'embryons de lin ( <i>Astral</i> ) âgés de 16 JAF avec 100 % [U- $^{13}\text{C}_5$ ]-glutamine.....	206
Tableau XXXIV : Enrichissements isotopiques des sucres libres après culture d'embryons de lin ( <i>Astral</i> ) âgés de 16 JAF en présence de 20 % de [U- $^{13}\text{C}_5$ ]-glutamine.....	208
Tableau XXXV : Enrichissements isotopiques du glucose provenant de l'hydrolyse de l'amidon après culture d'embryons de lin ( <i>Astral</i> ) âgés de 16 JAF en présence de 100 % de [U- $^{13}\text{C}_5$ ]-glutamine.....	209
Tableau XXXVI : Flux extracellulaires mesurés (nmol.h. <sup>-1</sup> embryon <sup>-1</sup> ). ....	212
Tableau XXXVII : Origine des précurseurs et des cofacteurs métaboliques pour la synthèse des huiles dans les embryons d'oléagineux, d'après O'grady <i>et al.</i> , 2012. ....	218
Tableau XXXVIII : Flux extracellulaires mesurés (nmol.h. <sup>-1</sup> embryon <sup>-1</sup> ). ....	223
Tableau XXXIX : Flux extracellulaires mesurés (nmol.h. <sup>-1</sup> embryon <sup>-1</sup> ). ....	227

## Résumé/Abstract

Les graines de lin sont composées de teneurs élevées en huile (45 g d'huile/100g MS) stockées sous forme de triglycérides dans l'embryon (Venglat *et al.*, 2011). Ces huiles hautement insaturées sont utilisées depuis de nombreuses années pour des applications industrielles (vernis, linoléum...). Toutefois, ces huiles riches en oméga-3 présentent également une grande importance pour la santé humaine. Pour cette raison, l'industrie alimentaire est particulièrement intéressée pour développer des produits enrichis en huile de lin. Pour répondre à cette demande, il est nécessaire de sélectionner des cultivars accumulant plus d'huile. Afin de sélectionner efficacement de telles plantes, il est nécessaire d'acquérir des connaissances sur les mécanismes de synthèse, d'accumulation et de régulation des huiles dans les graines oléagineuses (Sharma et Chauhan 2012). Pour comprendre les accumulations des huiles dans les graines de lin et leurs régulations, deux lignées de lin ayant des teneurs en huile différentes ont été sélectionnées (*Astral*:  $44,6 \pm 0,2$  g d'huile/100g MS ; 238 :  $37,0 \pm 0,7$  g d'huile/100g MS). Dans ce travail, nous avons déterminé les différences d'accumulation des composés de la graine entre les deux lignées dans les embryons, les téguments, la différence d'expression des gènes dans ces embryons et ces téguments, et analyser les flux métaboliques dans les embryons des deux lignées de lin durant la synthèse des acides gras. Ces études ont montré : (i) que les embryons de lin *Astral* qui accumule plus d'huile dans ses embryons accumule moins de protéines dans les embryons, (ii) que les téguments de lin *Astral* accumule moins de proanthocyanidines et de protéines que dans les téguments de la lignée 238, (iii) qu'aucun lien avec l'accumulation différente en huile dans les embryons et la différence d'accumulation dans les téguments n'a pu être mise en évidence, (iv) que le glucose est le précurseur carboné permettant la synthèse des acides gras, (v) que le flux de carbone permettant la synthèse des acides gras passe majoritairement par la glycolyse cytosolique jusqu'au PEP cytosolique qui est transporté dans le plaste pour être converti en pyruvate puis acétylCoA, précurseur de la synthèse des acides gras, (vi) que le flux permettant la synthèse de G3P est 29 fois plus élevée que dans les embryons de lin 238 que dans les embryons de lin *Astral*, (vii) : que la surexpression du gène codant pour la DHAP synthase (genolin\_c54022 317) et la G3PDH (genolin\_c10324 594) dans les embryons de la lignée *Astral/238*, pourraient induire une synthèse plus importante de G3P nécessaire à la formation des triglycérides.

Mots clés : lin, analyse des flux métaboliques, métabolisme carboné, transcriptomique, biosynthèse des lipides, spectrométrie de masse.