

Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc

Ecole Doctorale 167 : Biologie des systèmes intégrés. Agronomie. Environnement

DOSSIER DE CANDIDATURE
AU DIPLOME
D'HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Claudine CAMPA

2005

Equipe Génomique et Qualité du Café
UMR Diversité et Génome des Plantes Cultivées
IRD GeneTrop
911 Avenue Agropolis, BP 64501
34032 Montpellier Cedex 5

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| I. TITRES ET FONCTIONS | 1 |
| <i>I.1. ETAT CIVIL</i> | 1 |
| <i>I.2. TITRES UNIVERSITAIRES</i> | 1 |
| <i>I.3. SITUATION PROFESSIONNELLE</i> | 1 |
| <i>I.4. ACTIVITES D'ENCADREMENT</i> | 2 |
| <i>I.5. PARTICIPATION A DES ENSEIGNEMENTS</i> | 4 |
| II. PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES | 5 |
| III. TRAVAUX SCIENTIFIQUES | 8 |
| <i>III.1. PROPAGATION IN VITRO DE LIGNEUX</i> | 13 |
| III.1.1. Embryogenèse somatique chez <i>Vitis vinifera</i> | 13 |
| III.1.2. Régénération chez <i>Aeschynomene sensitiva</i> | 14 |
| <i>III.2. BIOSYNTHESE D'ALCALOIDES INDOLIQUES</i> | |
| <i>CHEZ CATHARANTHUS ROSEUS</i> | 16 |
| III.2.1. Situation du sujet | 16 |
| III.2.2. Stimulation de la production dans des cultures cellulaires | 17 |
| III.2.3. Amélioration de la production sur plantes entières | 23 |
| III.2.4. Conclusions | 27 |
| <i>III.3. METABOLISME DE L'AZOTE FIXE</i> | |
| <i>CHEZ LES ACACIAS SAHELIENS</i> | 28 |
| III.3.1. Situation du sujet | 28 |
| III.3.2. Accueil à l'INRA de Versailles | 30 |
| III.3.3. Résultats | 31 |
| <i>III.4. METABOLISME DES ACIDES CHLOROGENIQUES</i> | |
| <i>CHEZ LES CAFEIERS</i> | 36 |
| III.4.1. Situation du sujet | 36 |
| III.4.2. Projet de recherche initial | 40 |
| III.4.3. Résultats | 41 |
| III.4.4. Perspectives de recherche | 46 |
| IV. BIBLIOGRAPHIE | 52 |

I. TITRES ET FONCTIONS

1.1. ETAT CIVIL

Nom : **CAMPA** divorcée **NEF**

Prénom : Claudine

Date et lieu de naissance : 25/08/56 à Toulouse (31)

Adresse personnelle : 4 rue de la lavande 34820 TEYRAN

Nationalité : française

Situation de famille : mariée (épouse ROCHETEAU), un enfant

Situation professionnelle : CR1

Adresse professionnelle : IRD Montpellier

1.2. TITRES UNIVERSITAIRES

- 1983 Doctorat de Troisième Cycle, Institut National Polytechnique, Toulouse
 Commission d'examen : J. Fallot , J.C. Pech, M. Henry, G. Marigo, C. Ambid
- 1980 DEA de Physiologie Végétale, Université Paul Sabatier, Toulouse
- 1979 Maîtrise de Physiologie Végétale, Université Paul Sabatier, Toulouse

1.3. SITUATION PROFESSIONNELLE

- 1984-1985 Attachée de Recherche **ORSTOM** (Recrutement sur thèse)
 (Institut Français de Recherche Scientifique
 pour le Développement en Coopération)
- 1985-1991 Chargée de Recherche 2^{ème} classe **ORSTOM**
- 1991 - Chargée de Recherche 1^{ère} classe **IRD (ex-ORSTOM)**

1.4. ACTIVITES D'ENCADREMENT

- Bourses post-doctorales

Co-encadrement :

- ♦ **Nalapalli Samson** (Mars 2002- avril 2004) Transformation génétique des caféiers. Stage financé par le CEFIPRA (contrat Indo-French).

- Thèses de Troisième cycle

- ♦ **Diégane Diouf** (1995-1998) : Activité glutamine synthétase et fixation de l'azote atmosphérique chez *Faidherbia albida* (Del.) A. Chev. au Sénégal : influence du nitrate et de la diversité génétique de la plante, 1999. Univ. Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal. Directeur de thèse : C. Nef-Campa et M. Ba (Financement : IRD).

Actuellement Maître Assistant à l'Univ. Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal

9- Campa C, **Diouf D**, NDoye I, Dreyfus B, 2000. Differences in nitrogen metabolism of *Faidherbia albida* and other N₂-fixing tropical woody acacias reflect habitat water availability. New Phytol., 147 (3) : 571-578

- Thèses d'Université

Co-encadrement :

- ♦ **Mahesh Venkataramaiah (Depuis 2002-)** : Caractérisation et expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides chlorogéniques chez les caféiers. Thèse Univ. Montpellier II, France. Directeur de thèse : A. de Kochko (Financement privé).

Actuellement, position de cadre chez Avesthagen Graine, Bangalore, India.

Participation à l'encadrement :

- ♦ **Marie-Claude Mauro (1984)** : Embryogenèse somatique chez *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. Application à la sélection de clones résistants à *Eutypa lata* (Pers. : Fr.) Tul., 1986. Thèse Univ. Paul Sabatier, Toulouse. Directeur de thèse : J. Fallot (Financement MRT).

Actuellement, Responsable du Secteur Recherches, Gestion et Organisation du Vignoble chez Moët et Chandon, Epernay.

1- **Mauro MC**, Nef C, Fallot J, 1986. Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. Plant Cell Rep., 5: 377-380

- ♦ **Alain Rival (1986)** : Cinétique de la nutrition minérale et métabolisme du carbone et de l'azote dans des suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes, 1989. Thèse d' Univ. de Montpellier II. Directeur de thèse : H. Chrestin (Financement IRD).

Actuellement, chercheur CIRAD-CP, Montpellier.

- ♦ **Nadine Lambert (1989)** : Etude comparative de la biosynthèse de roténoïdes par des suspensions cellulaires hétérotrophes et photomixotrophes de *Tephrosia vogelii* Hook f. Essais d'optimisation de la production, 1989. Thèse d' Univ. de Montpellier II. Directeur de thèse : H. Chrestin (Financement IRD).

Actuellement déléguée commerciale (Société de produits de Laboratoire).

4- **Lambert N**, Trouslot MF, Nef-Campa C, Chrestin H, 1993. Production of rotenoids by heterotrophic and photomixotrophic cell cultures of *Tephrosia vogelii* Hook f. Phytochem., 34(6) : 1515-1520

- ◆ **Adama Diouf (1994)** : Caractérisation et utilisation de souches de *Rhizobium* isolées du haricot vert (*Phaseolus vulgaris*) dans la zone des niayes au Sénégal, 1995. Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal. Directeur de thèse : M. Gueye.

8- **Diouf A**, Ndoye I, Spencer MM, Nef-Campa C, Gueye M, 1999. Need for inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Senegal and assessment of nitrogen fixation using ¹⁵N isotope dilution technique. *Symbiosis*, 27 : 251-257

- DEA

- ◆ **Marie Sevestre-Rigouzzo (1989)** : Etude de la variabilité morphologique et biochimique de deux espèces de *Catharanthus* et de leurs hybrides interspécifiques. Intérêt du clonage par microbouturage *in vitro*, 1989. Fac. des Sciences et Techniques, Abidjan (RCI). Responsable : H. Chrestin.

3- **Sevestre-Rigouzzo M**, Nef-Campa C, Ghesquière A, Chrestin H, 1993. Genetic diversity and alkaloid production in *Catharanthus roseus*, *C. trichophyllus* and their hybrids. *Euphytica*, 66 : 151-159

- ◆ **Diégane Diouf (1995)** : Etude du métabolisme azoté chez quelques acacias tropicaux fixateurs d'azote, 1995. Univ. Cheikh Anta Diop, Dakar (Sénégal). Responsable : C. Nef-Campa.

Co-encadrement :

- ◆ **N'Deye Fatou Diaw Guene (1997)** : Réponses d'*Acacia seyal* à l'inoculation avec des souches de *Rhizobium* ou de *Bradyrhizobium* tolérantes au sel isolées au Sénégal, 1997. Univ. Cheikh Anta Diop, Dakar (Sénégal). Responsable : M. Gueye.

Actuellement Attachée au Ministère de l'Environnement du Sénégal.

- ◆ **Hassna Founoune (1997)** : Contribution à la caractérisation de *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. à l'aide de marqueurs morpho-physiologiques (biométrie) et génétiques (RAPD), 1997. Univ. Cheikh Anta Diop, Dakar (Sénégal). Responsable : MM. Spencer.

- ◆ **Claire Bertrand (2001)** : Teneur en acides chlorogéniques, activité et expression de la phénylalanine ammonia-lyase chez *Coffea pseudozanguebariae* et *Coffea canephora*, 2001. Univ. Montpellier II, Département Développement et Adaptation des Plantes, Biologie Moléculaire et Intégrative. Responsable : A. de Kochko.

Actuellement ATER à Jussieu (thèse soutenue en décembre 2004).

10- **Bertrand C**, Noirot M, Doubeau S, De Kochko A, Hamon S, Campa C, 2003. Chlorogenic acid content swap during fruit maturation in *Coffea pseudozanguebariae*. Qualitative comparison with leaves. *Plant Science*, 165 : 1355-1361

- DIRS

- ◆ **Michaël Bourgeois (2002)** : Caractérisation de gènes et d'enzymes impliqués dans la biosynthèse des acides chlorogéniques chez les caféiers, 2002. Univ. de Tours, Formation doctorale de Santé, Sciences et Technologies.

Actuellement en thèse à l'INSAM de Dijon (Judith Burstin).

11- Campa C, Noirot M, **Bourgeois M**, Pervent M, Ky CL, Chrestin H, Hamon S, De Kochko A, 2003. Genetic mapping of a caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase gene in coffee trees. Impact on chlorogenic acid content. *Theor. Appl. Genet.*, 107 : 751-756

- Diplôme élève Ingénieur

- ◆ **Lénaïg Le Gal (2001)** : Amélioration organoleptique du café Robusta par transformation génétique : recherche de gènes candidats, test de sensibilité à un agent sélectif et embryogenèse somatique, 2002. Mémoire de fin d'études, E.S.A, Angers.

Actuellement, création d'une société de culture *in vitro* d'orchidées.

Ressources génomiques :

Campa C, **Legal L**, Khounlotham M, Noiro M, de Kochko A, 2001. Complete cDNA sequence of a caffeic acid O-methyltransferase from *Coffea canephora* fruit. *Coffea canephora* fruit caffeic acid O-methyltransferase mRNA, complete cds. Accession AF454632 (03-DEC-2001)

Campa C, **Legal L**, Khounlotham M, Noiro M, de Kochko A, 2001. Complete sequence of a *Coffea canephora* leaf caffeic acid O-methyltransferase cDNA. *Coffea canephora* leaf caffeic acid O-methyltransferase mRNA, complete cds. Accession AF454631(03-DEC-2001)

Campa C, **Legal L**, Bertrand C, Constans L, Vigne H, Chrestin H, Noiro M, de Kochko A, 2001. Sequence of two phenylalanine ammonia-lyase (PAL) cDNA clones from leaves and fruit of *Coffea canephora*. *Coffea canephora* phenylalanine ammonia-lyase 2 mRNA, complete cds. Accession AF460204 et AF460203 (18-DEC-2001)

- Stages de Maîtrise

- ◆ **Racky Wone (ép. Kane) (1993)** : Techniques de dosage des composés azotés produits lors de la symbiose Légumineuses-*Rhizobium* : cas des uréides et des amides, 1993. Univ. de Bourgogne, Académie de Dijon, Maîtrise de Biologie Cellulaire, mention Sciences et Techniques du Végétal (MSTV).
- ◆ **Mame Fatou Niasse (1997)** : Analyse de la diversité de la fixation d'azote en fonction des origines géographiques de graines d'*Acacia albida*, 1997. Maîtrise de Physiologie Végétale, Univ. P. Sabatier, Toulouse.
- ◆ **Manirath Khounlotham (2001)** : Recherche du polymorphisme génétique des enzymes de la voie de biosynthèse des acides chlorogéniques chez les caféiers, 2001. Maîtrise de Physiologie Végétale, Univ. Montpellier II.

1.5. PARTICIPATION A DES ENSEIGNEMENTS

- Dakar : Cours International de Biotechnologies Végétales appliquées à l'agriculture, Réseau Africain de Biosciences (ABN), Dakar, 1994 (2 h de cours, 9 h de T.P.).
- Montpellier : IUP B3, 9 h de cours : les métabolites secondaires des plantes tropicales, depuis 2002.

II. PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

| REVUES | FACTEUR D'IMPACT | NOMBRE |
|-------------------------------------|------------------|--------|
| New Phytologist | 3,118 | 1 |
| Theoretical and Applied Genetics | 2,287 | 1 |
| Phytochemistry | 1,889 | 1 |
| Planta Medica | 1,879 | 1 |
| Plant Physiology and Biochemistry | 1,729 | 1 |
| Plant Science | 1,652 | 1 |
| Plant Cell Reports | 1,423 | 2 |
| Food Chemistry | 1,204 | 3 |
| Plant Cell Tissue and Organ Culture | 0,855 | 1 |
| Euphytica | 0,705 | 1 |
| Symbiosis | 0,606 | 1 |
| African Journal of Biotechnology | N.I. | 1 |

Liste des publications

Articles de rang A

- 15- **Campa C**, Doulebeau S, Dussert S, Hamon S, Noirot M, 2005. Diversity in bean caffeine content among wild *Coffea* species : evidence of a discontinuous distribution. *Food Chem.*, 91 : 633-637
- 14- **Campa C**, Doulebeau S, Dussert S, Hamon S, Noirot M, 2005. Qualitative relationship between caffeine and chlorogenic acid contents among wild *Coffea* species. *Food Chem.* Sous presse
- 13- Bustamante-Porras J, Noirot M, **Campa C**, Hamon S, de Kochko A, 2005. Isolation and characterization of a *Coffea canephora* ERF-like c-DNA. *Afric. J. Biotechnol.* Sous presse
- 12- **Campa C**, Ballester JF, Doulebeau S, Dussert S, Hamon S, Noirot M, 2004. Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. *Food Chem.*, 88(1) : 39-43
- 11- **Campa C**, Noirot M, Bourgeois M, Pervent M, Ky C, Chrestin H, Hamon S, de Kochko A, 2003. Genetic mapping of a caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase gene in coffee trees. Impact on chlorogenic acid content. *Theor. Appl. Genet.*, 107 : 751-756
- 10- Bertrand C, Noirot M, Doulebeau S, de Kochko A, Hamon S, **Campa C**, 2003. Chlorogenic acid content swap during fruit maturation in *Coffea pseudozanguebariae*. Qualitative comparison with leaves. *Plant Science*, 165 : 1355-1361
- 9- **Campa C**, Diouf D, NDoye I, Dreyfus B, 2000. Differences in nitrogen metabolism of *Faidherbia albida* and other N₂-fixing tropical woody acacias reflect habitat water availability. *New Phytol.*, 147 (3) : 571-578
- 8- Diouf A, NDoye I, Spencer MM, **Nef-Campa C**, Gueye M, 1999. Need for inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Senegal and assessment of nitrogen fixation using ¹⁵N isotope dilution technique. *Symbiosis*, 27 : 251-257
- 7- **Nef-Campa C**, Chaintreuil-Dongmo C, Dreyfus BL, 1996. Regeneration of the tropical legume *Aeschynomene sensitiva* Sw. from root explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 44 : 149-154
- 6- **Nef-Campa C**, Trouslot MF, Trouslot P, Chrestin H, 1994. Long-term effect of *Pythium* elicitor treatment on the growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus* cell suspensions. *Planta Med.*, 60(2) : 149-152
- 5- Becker TW, **Nef-Campa C**, Zehnacker C, Hirel B, 1993. Implication of the phytochrome in light regulation of the tomato gene(s) encoding ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Plant Physiol. Biochem.*, 31(5) : 725-729
- 4- Lambert N, Trouslot MF, **Nef-Campa C**, Chrestin H, 1993. Production of rotenoids by heterotrophic and photomixotrophic cell cultures of *Tephrosia vogelii* Hook f. *Phytochem.*, 34(6) : 1515-1520
- 3- Sevestre-Rigouzzo M, **Nef-Campa C**, Ghesquière A, Chrestin H, 1993. Genetic diversity and alkaloid production in *Catharanthus roseus*, *C. trichophyllus* and their hybrids. *Euphytica*, 66 : 151-159
- 2- **Nef C**, Rio B, Chrestin H, 1991. Induction of catharanthine synthesis and stimulation of major indole alkaloid production by *Catharanthus roseus* cells under non-growth-altering treatment with *Pythium vexans* extracts. *Plant Cell Rep.*, 10 : 26-29
- 1- Mauro MC, **Nef C**, Fallot J, 1986. Stimulation of somatic embryogenesis and plant regeneration from anther culture of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon. *Plant Cell Rep.*, 5 : 377-380

Liste des ouvrages

L'Acacia au Sénégal, **C. Campa**, C. Grignon, M. Gueye and S. Hamon Ed, Paris, 1998, Orstom Editions, collection Colloques et Séminaires, 476 p.

Liste des articles d'ouvrage

Diouf D, **Campa C**, Noirot M, 2001. Diversité de la capacité fixatrice d'azote de *Faidherbia albida* au Sénégal. Dans : Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes, S Hamon Ed, Paris, 2001, IRD Editions, collection Colloques et Séminaires, pp 143-156

Diouf D, **Campa C**, NDoye I, Dreyfus B, 1998. Assimilation de l'azote chez *Acacia albida* Del. Dans : L'Acacia au Sénégal, C. Campa, C. Grignon, M. Gueye and S. Hamon eds, Paris, 1998, Orstom Editions, collection Colloques et Séminaires, pp 221-233

Diaw-Guene F, **Campa C**, Gueye M, 1998. Sélection de souches de Rhizobium d'*Acacia seyal* tolérantes au sel. Dans : L'Acacia au Sénégal, C. Campa, C. Grignon, M. Gueye and S. Hamon eds, Paris, 1998, Orstom Editions, collection Colloques et Séminaires, pp 387-396

Diouf D, Laffont J, Chevallier H, **Nef-Campa C**, 1997. Effect of nitrate on nitrogen symbiotic fixation in *Acacia albida* Del. (syn. *Faidherbia albida*). Dans : Biological nitrogen fixation for the 21th Century, C. Elmerich, A. Kondorosi et W.E. Newton Eds, 1998, Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, Kluwer Academic Publishers, p 297

Nef C, Ambid C, Fallot J, 1987. Influence of external pH on alkaloid production and excretion by *Catharanthus roseus* resting cell suspensions. Dans : Plant vacuoles. Their importance in solute compartmentation in cells and their application in Plant Biotechnology. B. Marin Ed, Plenum Press New-York, London, pp 529-533

Participation à des congrès ou conférences

- Organisation d'une réunion thématique :
 - « L'acacia au Sénégal », Dakar, 3-5 décembre 1996, 45 participants.
- Participation en tant qu'invitée:
 - Réunion MIRCEN, octobre 1995, Dakar.
 - Congrès Réhabilitation des terres dégradées au Nord et au Sud du Sahara, janvier 1998, Dakar.
 - Réunion du comité d'évaluation du Coffee Board India, avril 2003, CCRI, India.
- Communications orales à des congrès/ réunions : 12

III. TRAVAUX SCIENTIFIQUES

Présentation des travaux de recherche (1980-2004)

Depuis le début de ma carrière, mon intérêt s'est porté sur l'étude du métabolisme secondaire des plantes tropicales. Mes recherches, tout d'abord axées dans le domaine de la biotechnologie, avaient essentiellement pour objectif l'obtention et la multiplication de matériel végétal riche en métabolites secondaires. Réalisé à l'aide de cellules cultivées *in vitro* (cals, suspensions cellulaires), ce travail reposait sur la mise en place de systèmes favorables à la biosynthèse et intégrait des études de physiologie cellulaire et de biochimie. Peu à peu, mes programmes se sont ensuite tournés vers les domaines de la génétique et de la biologie moléculaire, soit pour l'obtention de plantes productrices par croisements interspécifiques, soit pour la sélection de plantes par marqueurs génétiques. Le projet actuel, dédié à la génomique fonctionnelle, cherche à mettre en évidence la chaîne gène-protéine-fonction (et sa régulation) qui pourrait être impliquée dans la biosynthèse des métabolites secondaires.

Ces études ont porté sur différents types de métabolites secondaires :

- des métabolites à intérêt pharmacologique, tels que les alcaloïdes indoliques produits par *Catharanthus*,
- des métabolites intervenant dans les relations plante-microorganismes, tels que les uréides et les amides des acacias sahéliens pratiquant la symbiose
- des métabolites secondaires impliqués dans les critères de qualité alimentaire, tels que la caféine ou les acides chlorogéniques produits par les espèces du genre *Coffea*.

Les métabolites secondaires des végétaux sont des composés présents en faible concentration dans les plantes, leur teneur n'excédant que rarement le mg par g de matière sèche. Leur synthèse est réalisée par un très grand nombre de voies, très différentes les unes des autres, et parfois spécifiques d'un organe ou de certains types cellulaires. Leur structure moléculaire est plus complexe que celle des métabolites primaires dont ils dérivent. Leur biosynthèse nécessite de nombreuses réactions enzymatiques dont les plus courantes sont des méthylations, des hydroxylations ou des glucosylations. Initialement, ces composés étaient supposés non essentiels à la vie de la plante et parfois même considérés comme des déchets toxiques. Ils étaient également supposés être accumulés dans les vacuoles, alors considérées comme les zones « poubelles » des cellules végétales. Actuellement, leur intervention dans de nombreuses fonctions végétales est largement reconnue et leur localisation cellulaire n'est plus limitée à la vacuole. Leur rôle est parfois comparé à celui de notre système immunitaire, participant à la défense des plantes contre les pathogènes et les prédateurs. En effet, de nombreux métabolites secondaires ont des activités bactéricides ou

antifongiques, répulsives ou mêmes toxiques pour les parasites et les herbivores. Mais ils pourraient également jouer un rôle dans la reproduction et la dissémination des plantes. Ainsi, la pigmentation des fleurs fournit des couleurs attractives pour les insectes par qui la fécondation ou le transport du pollen seront assurés. Ces pigments constituent également une forme de protection contre les dangers environnementaux tels que les radicaux libres ou les rayonnements ultra violets.

Si l'utilité des métabolites secondaires pour les plantes n'a pas été immédiatement démontrée, leurs propriétés ont cependant été depuis très longtemps largement exploitées par l'homme dans différents secteurs de l'industrie tels que la chimie (colorants naturels végétaux, fragrances végétales), l'alimentation (additifs et arômes alimentaires), la cosmétique ou bien la pharmacie. Dans ce dernier secteur, plus de 80% des substances actives proviennent de plantes tropicales.

Les métabolites secondaires des plantes tropicales ne se distinguent pas de ceux des plantes tempérées dans le sens où ils appartiennent aux mêmes groupes majeurs de composés : les alcaloïdes, les composés phénoliques, les isoprénoides, les terpènes et les glucosides. Cependant, leur diversité moléculaire, liée à la forte biodiversité des espèces tropicales, est nettement plus importante et offre un plus grand éventail de molécules actives. Leur approvisionnement est parfois rendu difficile, à la fois parce que ces composés sont synthétisés en très faible quantité mais aussi à cause de leur origine géographique. C'est pourquoi, dès les années 70, des recherches ont été entreprises par les pays du Nord pour obtenir la production de ces composés sous les climats tempérés. Avec le développement des techniques de biotechnologie, de nombreux laboratoires ont établi des programmes de production, *in vitro*, de métabolites secondaires à haute valeur ajoutée.

C'est dans ce contexte que j'ai entamé, en 1980, une thèse de troisième cycle en Biotechnologie à l'ENSAT, sous la direction du Pr. Jean Fallot, sur la stimulation de la production d'alcaloïdes indoliques dans des suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus*. C'est également pour développer ce thème de recherche que j'ai été recrutée à l'Orstom en 1984, après une année post-doctorale à l'ENSAT (contrat CNRS/Moët-Hennessy) sur l'amélioration de la vigne par les voies de la biotechnologie végétale.

Ainsi, j'ai été affectée sur le centre Orstom d'Adiopodoumé (RCI) en 1985, au Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie Végétales dirigé par Hervé Chrestin, après un an de stage dans l'équipe du Pr. Alain-M. Boudet à l'Université P. Sabatier de Toulouse pour approfondir mes connaissances sur la photosynthèse. Pendant quatre ans, j'ai participé à un programme de production, par des cellules en culture, de substances végétales d'intérêt économique ou thérapeutique. Une partie du travail effectué sur *Catharanthus roseus* a été financée par la Société Pierre Fabre Médicaments. Suite à ces travaux, ma carrière, originellement axée sur la biotechnologie végétale, a évolué vers la physiologie moléculaire et la génomique fonctionnelle.

De 1990 à 1992, j'ai été accueillie au Laboratoire de Nutrition et Métabolisme azoté de l'INRA de Versailles (Pr. Jean-François Morot-Gaudry). Sous la direction de Bertrand Hirel, je me suis intéressée aux gènes codant pour les principales enzymes impliquées dans l'assimilation de l'azote fixé chez les plantes symbiotiques.

J'ai ensuite rejoint, en 1993, le Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'IRD de Dakar (Bernard Dreyfus) pour étudier les voies d'assimilation de l'azote fixé chez les acacias sahéliens pratiquant la symbiose bactérienne. En 1998, après avoir assumé durant une année la direction du Laboratoire de Génétique de l'IRD de Dakar, j'ai demandé à rejoindre l'IRD de Montpellier.

A la création des UR, j'ai intégré l'équipe Génomique des caféiers créée par Michel Noirod. Depuis 1999, je développe dans cette équipe un programme de génomique fonctionnelle basé sur la recherche ciblée de gènes-candidats pour l'amélioration de la qualité à la tasse du café Robusta. Dans cette étude, les gènes-cibles sont ceux impliqués dans les voies de biosynthèse des acides chlorogéniques. Le détail des différents sujets de recherche et affectations est porté dans le tableau 1 ci-après.

Etant donné le nombre de mes différentes affectations et la faible durée de certaines d'entre elles, ce mémoire ne présente pas une liste exhaustive de mes différentes recherches, mais une synthèse en quatre chapitres. Le premier regroupe les principales activités de recherche axées sur la biotechnologie, et plus particulièrement la culture *in vitro*. Les trois chapitres suivants concernent mes différentes recherches sur le métabolisme secondaire végétal. Leur titre reprend le thème de recherche abordé lors de mes affectations de longue durée (plus de deux ans) et ils présentent également les stages ou affectations de courte durée relevant de la même thématique de recherche. Cette présentation a l'avantage de respecter au maximum l'ordre chronologique, même si elle contraint à laisser de côté certaines de mes activités de recherche. Des perspectives de recherche s'inscrivant dans la continuité du travail actuel, seront proposées dans le dernier chapitre relatif aux travaux scientifiques.

Les références bibliographiques citées dans le texte sont recensées dans la partie « bibliographie » (Chap. IV), à l'exception des références personnelles qui sont regroupées dans la partie « publications scientifiques » (Chap. II).

Tableau I : RECAPITULATIF DES SUJETS DE RECHERCHE ET AFFECTATION

| Sujet de recherche | Lieu d'affectation | Dates d'affectation | Responsable scientifique | Publications scientifiques | |
|--|-------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|--------|
| | | | | Réf. CC | Autres |
| <i>Catharanthus roseus</i> Production d'alcaloïdes indoliques <i>in vitro</i> | ENSAT Toulouse | Septembre 1980 Juin 1983 | J. FALLOT | | 2 |
| <i>Vitis vinifera</i> Variation somaclonale et résistance à <i>Eutypa</i> | ENSAT Toulouse | Novembre 1983 Octobre 1984 | J. FALLOT (CNRS/ Moët-Hennessy) | 1 | 2 |
| <i>Melilotus alba</i> Métabolisme des photosynthétats | UPS Toulouse | Novembre 1984 Juin 1985 | A. BOUDET | | 1 |
| <i>Catharanthus roseus</i> Production d'alcaloïdes indoliques <i>in vitro</i> et <i>in planta</i> | IRD Abidjan RCI | Octobre 1985 | H. CHRESTIN | 3 | 6 |
| <i>Tephrosia vogelii</i> Production de roténoïdes <i>in vitro</i> | | Juillet 1990 | | 1 | 1 |
| Gènes GS et GOGAT Isolement et caractérisation. Rôle dans la fixation symbiotique d'azote | INRA Versailles | Septembre 1990 Juin 1992 | B. HIREL | 1 | |
| Acacias sahéliens Amélioration de la fixation d'azote | IRD Dakar Sénégal | Mars 1993 | B. DREYFUS | 2 | 7 |
| <i>Aeschynomene sensitiva</i> Régénération d'individus aptes à la fixation d'azote | | Juillet 1998 | | 1 | 1 |
| <i>Gossypium hirsutum</i> Etude des premiers événements de la réaction hypersensible | IRD Montpellier | Septembre 1998 Septembre 1999 | M. NICOLE | | 1 |
| <i>Coffea canephora</i> Métabolisme des acides chlorogéniques. Amélioration de la qualité | IRD Montpellier | Septembre 1999 - | M. NOIROT/ A. de KOCHKO | 6 | 17 |

III. 1. PROPAGATION *IN VITRO* DE LIGNEUX

Les techniques de propagation *in vitro*, qui consistent à régénérer une nouvelle plante à partir d'un fragment de ce végétal, permettent de multiplier à l'infini et, en principe, à l'identique des individus sélectionnés pour leurs caractéristiques intéressantes. Elles peuvent souvent constituer une étape préliminaire importante lors de la mise au point des techniques de transformation génétique. De nombreux exemples d'application existent chez les plantes herbacées, mais le transfert aux plantes ligneuses est relativement récent et orienté principalement sur les essences d'intérêt économique (*Eucalyptus*, *Citrus*, hévéa, café...).

Cette propagation peut être réalisée par développement d'un bourgeon axillaire ou adventif *in vitro* (micropropagation) d'individus déjà sélectionnés, mais elle peut aussi être faite en utilisant l'organogenèse ou l'embryogenèse somatique. Ces deux techniques mettent en jeu la totipotence des cellules végétales et la capacité de dédifférenciation des tissus mis en culture. Cette dernière phase peut induire une variation génétique et l'apparition, dans de faibles proportions, de somaclones.

La sélection d'individus performants s'effectue alors par application d'une contrainte de sélection dans le milieu de culture, favorisant le développement d'individus ayant acquis les caractéristiques souhaitées.

Pour obtenir une plante entière, l'organogenèse nécessite ensuite une phase de callogenèse et de différenciation *de novo* de méristèmes primaires, alors que l'embryogenèse somatique requiert uniquement la croissance de la structure bipolaire (axe tige-racine) que constitue l'embryon somatique.

La propagation *in vitro* a constitué l'essentiel de mes travaux de recherche lors d'une année post-doctorale portant sur l'amélioration de la vigne (ENSAT, 1983-1984, contrat DGRST 83.V.0322, CNRS/Moët-Hennessy) au cours de laquelle j'ai encadré le travail de thèse de MC. Mauro. J'ai également développé ces techniques pour une partie des recherches menées sur les espèces ligneuses tropicales fixatrices d'azote, lors de mon affectation à Dakar (1993-1998, Lab. de Microbiologie des Sols, IRD-ISRA).

L'expérience acquise à ce moment-là est également mise en œuvre dans le programme actuel portant sur les caféiers.

III.1.1. Embryogenèse somatique chez *Vitis vinifera*

De nombreux parasites sont susceptibles de s'attaquer à la vigne, *Vitis vinifera*. Parmi eux, un champignon, *Eutypa armeniacae* (ou *lata*), provoque une maladie du bois, le « dead arm » ou eutypiose, maladie qui peut entraîner jusqu'à 30% de perte de récolte sur certains cépages dont le Cabernet-Sauvignon. Généralement, dans les vignobles à « vin de table », l'amélioration de *V. vinifera* fait appel à l'hybridation inter et intraspécifique et à la sélection clonale. Dans le cas de vignobles d'appellation soumis à une législation réglementant l'encépagement, l'introduction par croisement de gènes étrangers à la variété ne peut être retenue.

Aussi, un programme mobilisateur « Biotechnologies » a été développé, à partir de 1983, par le Ministère de la Recherche et de la Technologie, avec le soutien de la société Moët-Hennessy, afin d'améliorer, à l'aide des biotechnologies, des cépages commercialement intéressants. Il proposait l'utilisation de la culture *in vitro* comme outil d'amplification de la variabilité. Les somaclones intéressants pour leur résistance à l'eutypiose seraient repérés après un passage sur un crible de sélection.

Dans ce projet à long terme, mon programme post-doctoral consistait en la mise en place du dispositif d'étude :

- définir les conditions de culture pour l'obtention d'embryogenèse somatique chez Cabernet-Sauvignon,
- définir des systèmes *in vitro* de sélection précoce d'individus résistants à *Eutypa*.

La régénération de plantules chez la vigne était obtenue à partir de nucelles (Srinivasan et Mullins, 1980), de tissus végétatifs ou d'anthers (Rajasekaran et Mullins, 1979 ; Bouquet et al, 1982) pour de nombreuses variétés, mais pas le Cabernet-Sauvignon. La première étape du travail consistait donc à mettre au point les techniques de régénération de ce cépage.

Le développement d'embryons somatiques de Cabernet-Sauvignon n'a pu être obtenu que par culture de tissus d'anthers. Cette embryogenèse apparaît lorsque les anthers sont prélevées avant anthèse et qu'elles renferment des microspores au stade proche de la première mitose du pollen. Ce stade physiologique peut facilement être déterminé par la longueur de l'anthere. Le développement d'embryoïdes sur les cals est favorisé par la présence d'hydrolysats de caséine ainsi que de glutamine et d'adénine dans le milieu de culture. De plus, le développement des embryons en plantules est accéléré par le retrait des cotylédons lors de la croissance *in vitro* (Mauro et al, 1986).

La mise au point des tests précoces de sensibilité à *Eutypa* a été réalisée sur des microboutures de Cabernet-Sauvignon en utilisant comme crible des milieux de culture enrichis en toxines d'*Eutypa* (souches d'*Eutypa armeniacae* provenant de l'INRA de Bordeaux). Les plantules ayant pu se développer sont alors multipliées par microbouturage sur le milieu contenant toujours l'agent de sélection.

La suite de ce travail a constitué une partie des travaux de thèse de MC Mauro. Elle consistait en l'application de ce crible de sélection sur les plantules obtenues par culture *in vitro* d'anthers. Des différences dans les analyses biochimiques et biométriques réalisées au niveau du 40^{ème} nœud des plantules permettent la mise en évidence des somaclones.

III.1.2. Régénération chez *Aeschynomene sensitiva*

Aeschynomene sensitiva SW. est une légumineuse tropicale à croissance rapide et pouvant se développer dans des milieux inondés. De plus, elle est capable d'établir des symbioses, au niveau des tiges, avec des *Bradyrhizobium*, bactéries

fixatrices d'azote. Cette colonisation donne naissance à des nodosités installées dans des sites prédéterminés correspondant à des primordia racinaires (Dreyfus et Dommergues, 1981). Le fonctionnement de cette symbiose, par l'assimilation de l'azote atmosphérique par la bactérie en échange d'une fourniture de source carbonée par la plante, enrichit la plante en azote, ce qui permet de l'utiliser comme engrais vert dans les rizières.

Dans le cadre d'un projet d'amélioration d'*Aeschynomene* devant conduire à la production d'individus performants (pour leur croissance ou leur aptitude à former des nodosités) ou résistants à des sols salins, une première étape du projet consistait à rechercher les conditions favorables à la propagation *in vitro* de cette plante. Des mises en culture de différents organes de la plante ont alors été effectuées sur différents milieux.

Les meilleures réponses ont été obtenues avec des fragments de racines issus de germinations et mis en culture dans des milieux solides riches en agar (8 g/L) et en cytokinines. Lorsque la taille de ces fragments est inférieure à 7 mm de long, la régénération est obtenue de façon indirecte, après développement d'un cal. Pour une taille d'explant supérieure (mais inférieure à 20 mm), la régénération est directe. Les parties caulinaires sont alors transférées sur un nouveau milieu pour la régénération des racines. Les plantules ainsi obtenues se sont révélées tout à fait aptes à pratiquer la symbiose avec des *Bradyrhizobium* (Nef-Campa et al, 1996).

III.2 BIOSYNTHESE D'ALCALOÏDES INDOLIQUES CHEZ *CATHARANTHUS ROSEUS*

L'étude de la production d'alcaloïdes indoliques chez *Catharanthus roseus* a été abordée à la fois en culture *in vitro* et sur plantes entières. Quel que soit le matériel utilisé, l'objectif final était d'augmenter la production de ces métabolites en utilisant des techniques communes (application de stress) ou propres à chaque matériel (modification des techniques de culture *in vitro* ou croisement interspécifique et micropropagation).

Le travail a été réalisé à l'ENSAT, de 1980 à 1983, dans le cadre d'une thèse de troisième cycle sous la direction du Pr. Jean Fallot, puis au Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie Végétales de l'ORSTOM d'Abidjan, de 1987 à 1990, lors de ma première expatriation pour l'IRD (ex-ORSTOM). Une partie de ces derniers travaux a fait l'objet d'un contrat (ORSTOM-CRPF : Société Pierre Fabre Médicaments) pour lequel j'ai pu mettre en œuvre mon savoir-faire en biotechnologies et physiologie des cellules végétales, mais également aborder la génétique des plantes.

Lors de mon affectation en Côte d'Ivoire en tant que Chargée de Recherche, j'ai encadré des étudiants (dont une étudiante en DEA, M. Sevestre-Rigouzzo) sur le sujet *Catharanthus* et participé aux travaux d'étudiants en thèse sur d'autres thèmes de recherche : production de saponines triterpéniques chez *Abrus precatorius* (A. Rival) et de roténoïdes chez *Tephrosia vogelii* (N. Lambert).

III.2.1. Situation du sujet

Près de 80% des substances naturelles utilisées dans le domaine biomédical proviennent de plantes tropicales. C'est le cas de la vincristine et de la vinblastine, deux alcaloïdes dimères recherchés pour leur activité anti-tumorale (Fig. 1). Extraits de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, pervenche originaire de Madagascar, ces composés sont très faiblement accumulés dans la plante (teneurs inférieures à 0.001% de la matière sèche). Aussi, d'importantes récoltes sont nécessaires (50 tonnes par an) pour obtenir la matière active indispensable aux besoins thérapeutiques mondiaux. Leur rareté ainsi que les aléas de l'approvisionnement liés aux contraintes politiques des pays tropicaux fournisseurs justifient leur très haute valeur commerciale. De plus, leur niveau de production varie suivant l'organe (Endo et al, 1987), les individus (Levy et al, 1984), les lieux de récolte ou les conditions de culture (Daddona et al, 1976) mais également selon le stade de développement de la plante (Reda, 1978). Aussi, les industries pharmaceutiques ont cherché à développer des outils permettant de connaître les voies métaboliques afin de tenter de les réguler. Les cultures *in vitro* de cellules végétales semblaient répondre à ces objectifs, pouvant apporter une production constante de métabolites tout en se débarrassant des contraintes géographiques. C'est ainsi que de nombreuses souches cellulaires de *C. roseus* ont vu le jour et ont servi d'outil pour l'étude du métabolisme des alcaloïdes.

Cependant, le manque de rentabilité de ces approches biotechnologiques a été rapidement mis en évidence. Les industriels ont alors cherché à exploiter la biodiversité pour sélectionner les individus les plus producteurs. L'ORSTOM, de par ses nombreuses implantations en milieu tropical, occupait une place de choix pour intervenir dans ces recherches. C'est ainsi qu'en collaboration avec le Laboratoire Pierre Fabre j'ai développé un programme d'amélioration de la production d'alcaloïdes indoliques sur des plantes entières de *Catharanthus*.

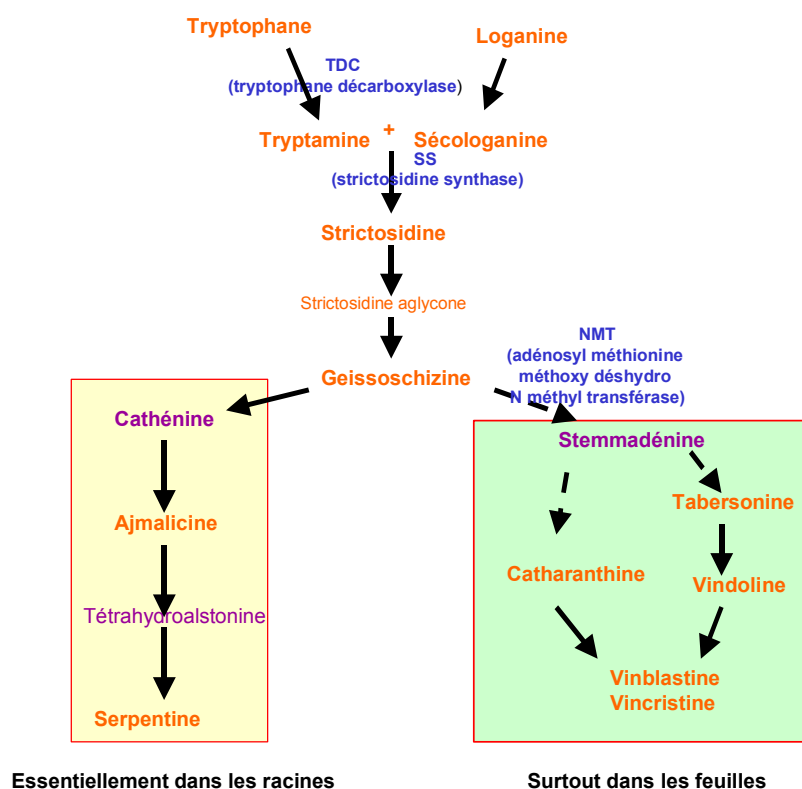


Figure 1. Schéma de la voie de biosynthèse des alcaloïdes indoliques de *Catharanthus roseus*.

Ce projet n'est malheureusement pas arrivé à terme, les chercheurs de l'ORSTOM ayant dû quitter le centre d'Adiopodoumé en 1998, après la transformation du centre d'Adiopodoumé en Centre International de Recherche (IIRSDA).

III.2.2. Stimulation de la production d'alcaloïdes dans des cultures cellulaires

Les suspensions cellulaires sont couramment qualifiées de tissus « différenciés » dans le sens où les cellules du tissu végétal qui leur ont donné naissance ont perdu les caractéristiques particulières qu'elles avaient au sein de l'organisme entier. Par dérégulation de leur programme génétique, elles ont regagné une sorte de totipotence qui les rend susceptibles d'exprimer des propriétés originales par rapport à la plante dont elles sont issues. Cette

particularité a été utilisée dans des suspensions cellulaires de *C. roseus* pour sélectionner des lignées cellulaires produisant des teneurs intéressantes en alcaloïdes indoliques (Stockigt et al, 1976 ; Zenk et al, 1977). Ce métabolisme alcaloïdique n'est pas rigoureusement identique à celui des plantes entières (Pétiard et al, 1982). Quelles que soient les souches cellulaires obtenues, aucune ne produit les dimères anticancéreux en quantité assez importante pour être dosables. Seuls, deux composés dérivés de la voie de synthèse, l'ajmalicine et la serpentine, se trouvent synthétisés en grande quantité par ces cultures.

En culture cellulaire liquide, le métabolisme alcaloïdique s'exprime essentiellement à la fin de la phase exponentielle de croissance, à l'entrée de la culture en phase stationnaire. Il se maintient pendant un court laps de temps, avant l'entrée en sénescence des cellules. La biosynthèse des alcaloïdes est sous l'influence de facteurs environnementaux tels que la température (Courtois et Guern, 1980), la lumière (Lee et al, 1981), le type de module de culture (Wagner et Vogelmann, 1977) ou la présence de précurseurs métaboliques (Courtois et al, 1980). La composition du milieu de culture joue également un rôle important, en particulier *via* la teneur en source carbonée, en minéraux ou en régulateurs de croissance. Ainsi, la production alcaloïdique est stimulée en conditions limitantes en saccharose et en phosphate (Balagué et Wilson, 1982). Cette observation a pu être réalisée par l'utilisation de fortes quantités de biomasse maintenues en survie dans des unités de culture particulières appelées chémostats. Une augmentation de la production est également obtenue en privation d'auxine, particulièrement le 2,4-D (Knobloch et Berlin, 1980 ; Roustan, 1981). En fait, les conditions de stress, souvent génératrices d'un ralentissement du métabolisme primaire, apparaissent par contre favorables à l'expression du métabolisme secondaire, souvent impliqué dans les mécanismes de résistance. L'emploi d'éliciteurs (agents induisant la synthèse de phytoalexines dans les plantes) biotiques (infection par microorganismes ou apport de préparations stériles de cultures de microorganismes) ou abiotiques (irradiations, substances chimiques...) a d'ailleurs permis l'induction de certaines enzymes de la voie de biosynthèse des alcaloïdes indoliques (Eilert et al, 1986). Ces réponses au stress s'accompagnent souvent de l'excrétion des alcaloïdes dans le milieu de culture. L'étude des mécanismes d'excrétion et de compartimentation cellulaire de ces composés a montré que le pH intra ou extracellulaire était un facteur déterminant (Courtois et Pétiard, 1981 ; Renaudin et Guern, 1982).

Mon travail de thèse étant axé sur l'optimisation de l'accumulation et de l'excrétion des alcaloïdes chez *Catharanthus roseus*, un rapide bilan de ces premiers résultats m'a conduit à développer une double stratégie. La première consistait à développer un système de culture favorisant la production d'alcaloïdes. Pour cela, à partir des conditions de culture « batch » mises au point au Laboratoire, j'ai adapté un système de culture en continu permettant le maintien des cellules en survie et leur production pendant la phase d'arrêt de croissance prolongée. La deuxième était de pratiquer, dans ce système, des modifications de pH du milieu pendant la phase de production d'alcaloïdes, afin d'étudier les échanges de métabolites entre cellules et milieu.

Lors de mon affectation à Adiopodoumé, le travail effectué sur suspensions cellulaires a surtout été réalisé en milieu non renouvelé, en appliquant plusieurs types de stress.

•III.2.2.1. Mise au point d'un système de culture en continu favorable à la production d'alcaloïdes

La culture en continu consiste à utiliser un volume important de biomasse, placé dans un bioréacteur, auquel on apporte constamment du milieu de culture neuf, en retirant dans le même temps un volume égal de milieu de culture (Fig. 2). Ce système expérimental permet de moduler avec précision certains facteurs environnementaux comme la teneur en éléments nutritifs (source carbonée, azotée ou minéraux) ou en substances de croissance. Il nécessite cependant de définir certains paramètres de culture afin d'obtenir une courbe de croissance classique comportant une phase de latence courte et une phase exponentielle de croissance suivie d'une phase stationnaire. Pour une optimisation de la production de biomasse, il est nécessaire de définir quatre paramètres de culture : le volume cellulaire initial d'ensemencement, la vitesse d'agitation de la culture, le débit de renouvellement du milieu et le volume d'aération. Dans un premier temps, le laboratoire ne disposant que de bioréacteurs dédiés à la culture de bactéries (type New Brunswick), mon travail a consisté à adapter le matériel aux cellules végétales, beaucoup plus fragiles et présentes en moins grande densité.

Pour des cellules habituées à croître en milieu riche en substances de croissance de type auxinique (2,4-D dans le cas de la souche C_{20} utilisée), une culture réalisée dans un milieu dépourvu d'auxine stimule la production de métabolites secondaires mais conduit à une phase de croissance très courte accompagnée d'un taux de mortalité élevé. Pour la souche C_{20} de *C. roseus*, la mortalité cellulaire peut être limitée par l'apport de mannitol (200 mM) dans le milieu de culture (Roustan, 1981).

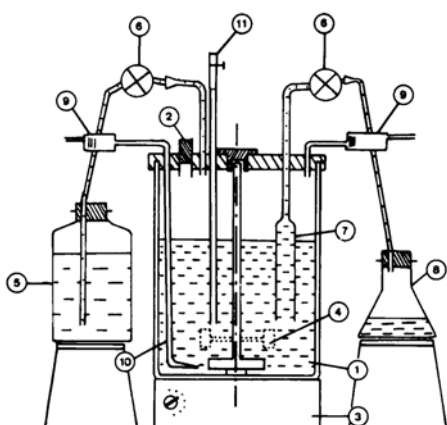


Figure 2. Module de culture des cellules végétales.

1 : bioréacteur de volume utile 1,25 L; 2 : dispositif d'inoculation; 3 : agitateur mécanique; 4 : hélice amovible; 5 : réserve de milieu; 6 : pompe péristaltique; 7 : tube à décantation; 8 : récipient de stockage du milieu de sortie ou "effluent"; 9 : cartouche de filtration de l'air; 10 : canne de verre distribuant l'air filtré; 11 : prise d'essai; 12 : débitmètre.

La culture de la souche C_{20} dans le bioréacteur, en milieu renouvelé dépourvu d'auxine et enrichi en mannitol, aboutit à une courbe de croissance classique de suspensions cellulaires, pour des conditions d'agitation, d'aération et

de renouvellement de milieu bien définies. Ce milieu permet non seulement de limiter la mortalité cellulaire observée en absence d'auxine mais également de prolonger la survie des cellules quinze jours après la phase de croissance (Ambid et al, 1982). C'est pendant cette période de quiescence que la production d'alcaloïdes est importante: ajmalicine et serpentine sont produits à la concentration de 0,321 et 0,065 $\mu\text{g} \cdot 10^{-6}$ cellules après 18 jours de culture, soit respectivement 7 et 3 fois plus que pour des cellules en fin de culture dans les conditions standard (milieu renouvelé enrichi en 2,4-D).

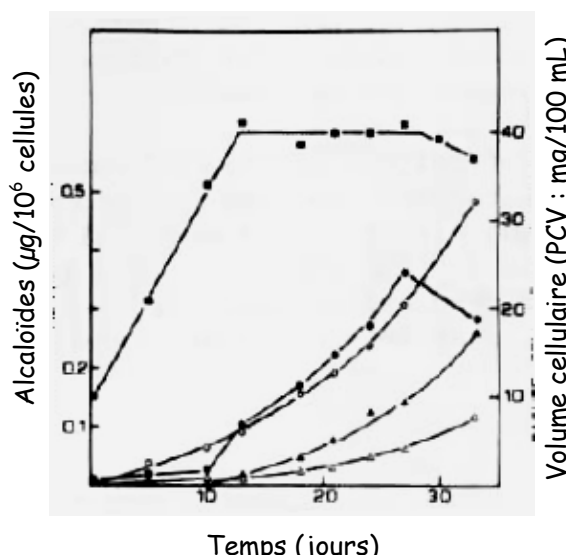


Figure 3. Evolution des teneurs en ajmalicine et serpentine pendant la croissance de suspensions cellulaires de *Catharanthus roseus* dans un milieu renouvelé sans 2,4-D et enrichi en mannitol (200 mM). Ajmalicine dans les cellules (●—●), dans le milieu (○—○), serpentine dans les cellules (▲—▲), dans le milieu (△—△).

La majeure partie de ces composés est excrétée, surtout dans les premiers jours de culture. Lors de la phase de maintien en survie, 50% de l'ajmalicine et 30% de la serpentine sont retrouvés, en moyenne, dans le milieu (Fig. 3). Ce système de culture est donc performant, puisqu'il permet à la fois d'augmenter la production des métabolites recherchés et qu'il facilite leur diffusion dans le milieu extérieur. Cette dernière caractéristique est très intéressante car elle permet d'obtenir les composés recherchés dans le liquide effluent. L'obtention des composés alcaloïdiques est alors simplifiée, puisque la phase d'extraction des cellules végétales n'est plus nécessaire.

• III.2.2.2. Stimulation de la production par application de stress

A) Stress par modification du pH du milieu de culture dans un système renouvelé

Les alcaloïdes indoliques sont des bases faibles, dont le pK est égal à 6,3 pour l'ajmalicine et 10 pour la serpentine. Leur accumulation cellulaire est réalisée dans des compartiments acides tels que la vacuole. Un modèle d'accumulation et de transport trans-membranaire passif des formes neutres, établi suivant la loi de Waddel et Buttler (1959) et basé sur le piégeage des ions dans la vacuole, a été proposé par Renaudin (1982). Après leur synthèse dans le cytoplasme, les formes chargées resteraient dans le compartiment cytoplasmique, alors que les formes neutres pourraient migrer à travers la membrane vacuolaire. La proportion de

formes neutres/chargées dépend du pK et est donc propre à chaque composé. Dans le cytoplasme, dont le pH est proche de 7, une partie de molécules synthétisées d'ajmalicine est présente sous forme neutre, donc libre de traverser les membranes cellulaires, alors que la serpentine y serait en grande partie sous forme chargée, donc piégée dans le cytoplasme.

Des mesures de pH ont été réalisées dans nos cultures et tendent à montrer la validité de ce modèle, surtout pour l'ajmalicine. La mesure du pH intracellulaire (pHi) a permis de situer la valeur du pH vacuolaire entre 6,1 et 6,4. Le pH du milieu évolue pendant la culture : en dessous de 6 pendant les phases de latence et de croissance, il atteint une valeur maximum de 6,4 lors de la phase stationnaire. Si l'on regarde la proportion d'alcaloïdes excrétée durant la culture, deux éléments majeurs sont à retenir : tout d'abord, c'est pendant la phase de latence que l'excrétion est la plus forte, c'est-à-dire lorsque la valeur du pH externe tend vers la valeur de celui de la vacuole. Ensuite, le taux d'excrétion est plus élevé pour l'ajmalicine, l'un des deux alcaloïdes le plus présent sous forme neutre dans le cytoplasme. Ainsi, un milieu de culture dont le pH est voisin de celui de la vacuole pourrait constituer, au même titre que la vacuole, un compartiment acide vers lequel les alcaloïdes sous forme neutres seraient « dirigés » et piégés.

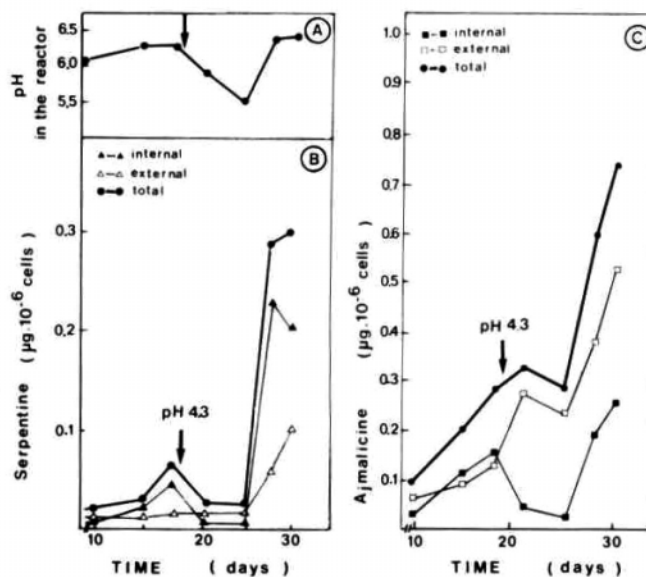


Figure 4. Influence de l'acidification du milieu de renouvellement sur le pH dans le réacteur (A), sur la production et la distribution de la serpentine (B) et de l'ajmalicine (C).

Pour vérifier cette hypothèse, des apports de milieu à pH acide ont été effectués pendant la phase stationnaire, après 18 jours de mise en culture. La valeur minimale de pH externe tolérée par les cellules a été testée au préalable et évaluée à 4,3. Etant données les conditions de culture (apport constant de milieu neuf à faible débit), l'acidification du milieu dans le bioréacteur augmente progressivement. Le milieu de culture dans lequel baignent les cellules est entièrement renouvelé au bout de 6 jours. La réponse des cellules à cette lente acidification s'effectue en deux phases. Tout d'abord, pendant les 6 premiers

jours de stress, les cellules ne réagissent pas à l'acidification lente du milieu qui passe de pH 6,3 à 5,5 (Fig. 4). Durant cette période, si l'évolution de la teneur globale en ajmalicine n'est que sensiblement modifiée, celle de la serpentine est très fortement altérée, les teneurs tombant à des valeurs proches de celles observées en phase de croissance. De plus, les deux alcaloïdes sont essentiellement présents dans le milieu de culture, sans que cela corresponde au même phénomène physiologique. Pour l'ajmalicine, la forte proportion de composé extracellulaire est liée à une forte excrétion, alors que, pour la serpentine, elle est due à une dégradation intercellulaire du composé. Ensuite, à partir du 24^{ème} jour de culture, bien que le milieu soit toujours apporté à une valeur de pH de 4,3, le pH externe dans le bioréacteur est ramené par les cellules à la valeur de 6,5. La synthèse d'ajmalicine et serpentine est stimulée pendant cette période, les teneurs totales après 30 jours de culture étant respectivement de 0,75 et 0,31 $\mu\text{g}\cdot 10^{-6}$ cellules, soit 2 et 5 fois plus que les valeurs observées avant le stress (Nef et al, 1987). Les deux composés ne présentent cependant pas la même distribution entre cellules et milieu : alors que plus de 60% de l'ajmalicine sont retrouvés dans le milieu de culture, seulement 30% de la serpentine sont excrétés. Cette diminution de teneur extracellulaire correspond, pour les deux composés, à une accumulation cellulaire des produits néo-synthétisés.

L'ensemble de ces résultats montre tout d'abord que la synthèse et l'accumulation des alcaloïdes dépendent du composé considéré. De plus, on peut noter que le métabolisme des deux alcaloïdes ne subit pas les mêmes modifications lors d'un stress à pH acide : l'acidification du milieu ne ralentit pas la synthèse de l'ajmalicine mais favorise son transport vers un compartiment acide, alors qu'on assiste plutôt à un catabolisme de la serpentine. Si l'ajmalicine semble bien suivre la loi de Waddel et Buttler (accumulation dans les compartiments acides et mécanisme passif des molécules à travers les membranes, lié à la valeur du pK de la base), le mécanisme d'accumulation semble plus complexe pour la serpentine. Il sera d'ailleurs montré ultérieurement que la serpentine est synthétisée à partir de l'ajmalicine uniquement dans la vacuole et que son transport trans-membranaire dépend d'un mécanisme actif (Deus-Neumann et Zenk, 1986).

B) Stress biotique sur suspensions cellulaires en milieu non renouvelé

Ce travail a été réalisé sur des suspensions cellulaires initiées à partir d'hypocotyles de *Catharanthus roseus* récoltés localement. Ces cultures sont entretenues dans un milieu modifié de Murashige et Skoog (1962) contenant du 2,4-D (0,45 μM) et de la kinétine (4,5 μM) comme substances de croissance et du saccharose (2% p/v). Une culture de mycélium de *Pythium vexans* (de Bary), récolté dans des zones nécrotiques de feuilles de *C. roseus*, a servi de source d'extrait brut d'éliciteur après traitement à l'éthanol. Plusieurs concentrations ont été testées pendant les différentes phases de la culture. Les résultats les plus intéressants sont obtenus lorsque l'apport d'éliciteur est pratiqué à faible concentration dès le premier jour de culture. Non seulement la synthèse d'ajmalicine et de serpentine est augmentée, mais une importante synthèse de

catharanthine est observée, alors que ce composé, précurseur des dimères antitumoraux, n'avait jamais été détecté auparavant (Nef et al, 1991). Il faut cependant noter que l'application d'un nouveau stress au cours de la phase de croissance de la culture a un effet inhibiteur sur la synthèse des alcaloïdes. De même, l'application de stress sur des suspensions élicitées au premier jour puis remises en culture ne permet pas de stimuler la production (Nef-Campa et al, 1994).

III.2.3. Amélioration de la production sur plantes entières

Deux problèmes majeurs sont rencontrés dans l'exploitation du *C. roseus* pour ses métabolites secondaires : la faible teneur en composés, qui contraint à réaliser de grandes campagnes de récolte et surtout la forte diversité de teneurs entre individus, même pour des lots sélectionnés de graines, qui ne permet d'avoir une bonne idée de la teneur moyenne des lots. Pour répondre à la première problématique, des modifications environnementales par stress biotiques ou abiotiques ont été réalisées pour essayer de définir les conditions favorables à la production chez *C. roseus*. Ensuite, nous avons réalisé un croisement entre *C. roseus* et *C. trichophyllus*, une espèce beaucoup plus vigoureuse et aux caractéristiques de production intéressantes, afin de voir si la vigueur hybride pouvait être également observée sur les productions de métabolites secondaires. Pour répondre à la deuxième question, nous avons obtenu des lignées de *C. roseus* par microbouturage *in vitro* et nous avons regardé si, comme dans le cas du métabolisme primaire, le clonage permettait une stabilisation de la production.

• III.2.3.1. Application de stress abiotique ou biotique

Trois types d'agents, connus pour provoquer des réactions physiologiques chez les plantes, ont été apportés à des plants de *Catharanthus* âgés de quatre mois afin d'étudier leurs effets sur le métabolisme des alcaloïdes (Nef-Campa, 1992).

L'éthrel est un produit chimique intervenant dans la sénescence car il est assimilé par la plante sous forme d'éthylène, composé classé parmi les hormones végétales accompagnant le vieillissement. Apporté par pulvérisation des feuilles ou arrosage, il a pour effet majeur d'augmenter de façon très importante la teneur en catharanthine dans les racines (20 à 30 fois plus que les témoins).

Des solutions salines (50 et 100 mM NaCl) ont été utilisées pour arroser des plants de *Catharanthus*. Les plus fortes réponses ont été obtenues avec les fortes concentrations en sel, sans qu'il y ait altération de la croissance. Une accumulation plus forte de la serpentine et de la catharanthine est observée à la fois dans les feuilles et les racines dès le sixième jour de traitement. Ce résultat est en accord avec l'observation d'une plus forte teneur en alcaloïdes pour les plants de *Catharanthus* récoltés sur le littoral.

Un extrait fongique (*Fusarium*) est apporté par arrosage après lacération des racines pour une meilleure pénétration de la solution. Dès 48 heures de

traitement, on note une augmentation globale de la teneur en alcaloïdes, avec une accumulation de la catharanthine dans les feuilles après 120 heures.

De même que pour les suspensions cellulaires qui en sont issues, les plantes répondent aux stress environnementaux par une augmentation de la teneur en alcaloïdes.

• III.2.3.2. Croisement interspécifique

Ce travail a été essentiellement réalisé par une étudiante de troisième cycle (M. Sevestre-Rigouzzo, DEA, Abidjan) que j'ai co-encadrée avec Alain Ghesquière (IRD).

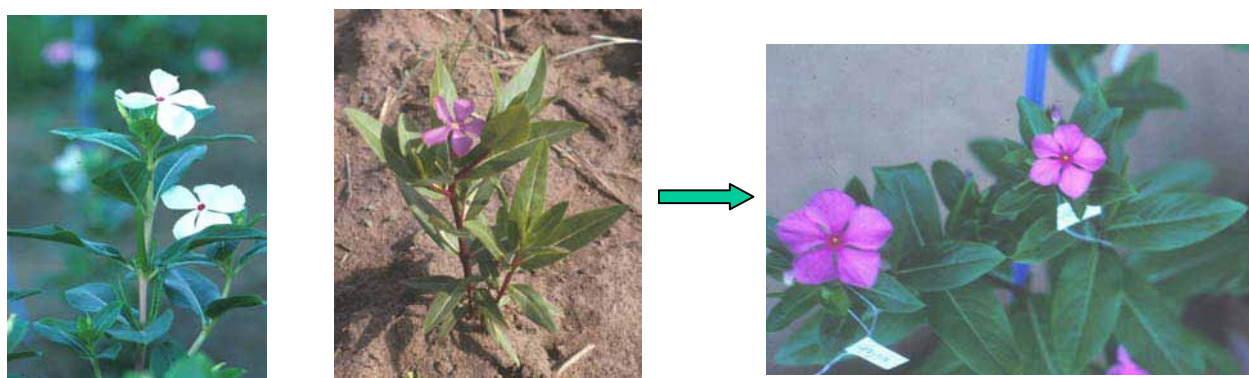


Figure 5. Croisement entre *C. roseus* et *C. trichophyllus*. Aspect des hybrides.

Le croisement de *C. roseus* a été effectué avec l'espèce *C. trichophyllus* (Baker) Pichon à partir d'individus de F2 (sur 100 plantes issues de graines fournies par la Société Pierre Fabre Médicaments, 100 graines ont été récoltées au hasard pour chaque espèce et semées à leur tour). Dans chaque espèce, 36 plantes ont été récoltées après 130 jours de culture pour les caractériser morphologiquement (Fig. 5), étudier leur polymorphisme isozymique et leurs caractéristiques biochimiques sur le plan de la production alcaloïdique. Les *C. trichophyllus* sont nettement plus vigoureux et se distinguent des *C. roseus* par leur profil isozymique et les teneurs en alcaloïdes des feuilles et des racines.

Le croisement entre les deux espèces n'a permis d'obtenir une descendance qu'en utilisant *C. trichophyllus* comme parent femelle et *C. roseus* comme mâle.

Ces hybrides possèdent des caractéristiques biochimiques supérieures à celles des deux parents et présentant des variances plus faibles (Sevestre-Rigouzzo et al, 1993). Les plus grands effets sont observés en analysant le contenu des feuilles où les teneurs en vindoline et catharanthine sont multipliées par trois par rapport aux parents (Fig. 6).

Ces résultats tendent à montrer que l'amélioration génétique de *C. roseus* est possible en exploitant l'hétérosis entre *C. roseus* et *C. trichophyllus*.

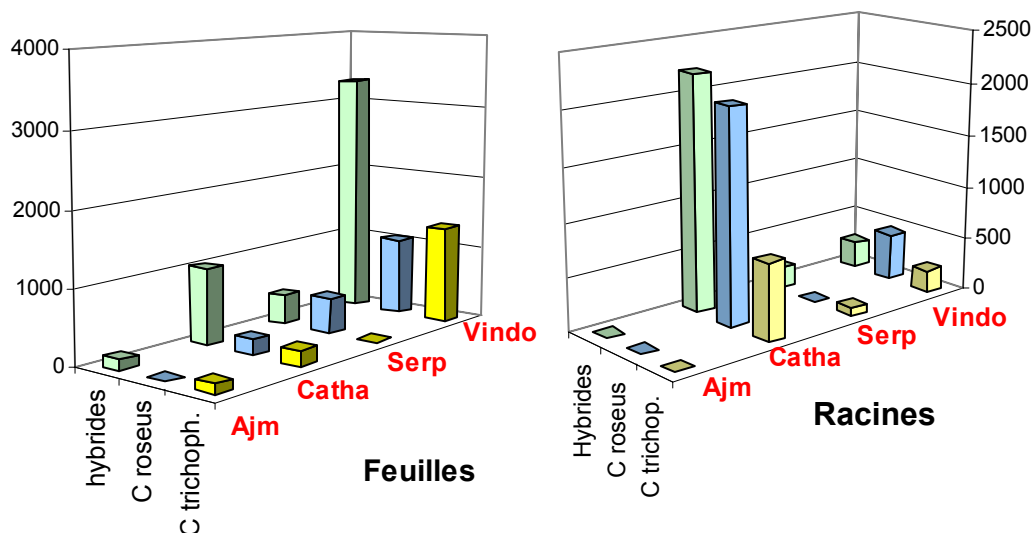


Figure 6 . Comparaison des teneurs (exprimées en $\mu\text{g. g}^{-1}$ MS) en principaux alcaloïdes indoliques des feuilles et racines de *C. roseus*, *C. trichophyllus* et de leurs hybrides.

• III.2.3.3. Microbouturage

Pour connaître l'impact des facteurs environnementaux sur la teneur en alcaloïdes indoliques des plantes, quatre clones ont été obtenus par micropropagation *in vitro* à partir de graines de *C. roseus*. L'étude de la diversité des marqueurs physiologiques et biochimiques dans chaque clone montre que la variance de tous les paramètres est très largement diminuée, passant en moyenne de 80 % dans un lot de graines sélectionnées (Tab. 2) à 10% dans le clone (Tab. 3).

Cette forte diminution de la variance, observée pour des clones ayant poussé dans les mêmes conditions environnementales que les individus issus de graines, montre que les écarts de production observés entre individus issus de graines ne sont que très faiblement attribuables aux facteurs environnementaux (Sevestre-Rigouzzo, DEA).

Cette observation, associée à celle de la vigueur hybride obtenue lors des croisements, semble indiquer que les teneurs en alcaloïdes sont fortement dépendantes des caractéristiques génétiques de la plante.

L'association des croisements interspécifiques qui permettent d'obtenir des hybrides vigoureux et producteurs, et de la micropropagation, qui favorise la stabilisation des teneurs en alcaloïdes entre individus, pourrait être un moyen original d'améliorer la production d'alcaloïdes chez les *Catharanthus*.

Tableau 2. Teneur en principaux alcaloïdes dans les feuilles et racines de plants en floraison issus de graines sélectionnées pour leur production (n = 9).

| Alcaloïde | Feuilles | | | Racines | | |
|---------------|-------------------|------------|---------------------|-------------------|------------|---------------------|
| | Moyenne (µg/g MS) | Ecart-type | Coefft de variation | Moyenne (µg/g MS) | Ecart-type | Coefft de variation |
| Ajmalicine | - | - | - | 447 | 246 | 0.55 |
| Catharanthine | 222 | 103 | 0.46 | - | - | - |
| Serpentine | 458 | 101 | 0.22 | 2007 | 673 | 0.33 |
| Vindoline | 1056 | 319 | 0.30 | - | - | - |

Tableau 3. Teneur en principaux alcaloïdes dans les feuilles et racines de plants en floraison obtenus par micropropagation à partir d'une seule graine (n = 18).

| Alcaloïde | Feuilles | | | Racines | | |
|---------------|-------------------|------------|---------------------|-------------------|------------|---------------------|
| | Moyenne (µg/g MS) | Ecart-type | Coefft de variation | Moyenne (µg/g MS) | Ecart-type | Coefft de variation |
| Ajmalicine | - | - | - | 2892 | 262 | 0.09 |
| Catharanthine | 1103 | 104 | 0.095 | - | - | - |
| Serpentine | 572 | 101 | 0.177 | 6287 | 794 | 0.13 |
| Vindoline | 2006 | 192 | 0.096 | - | - | - |

III.2.4. Conclusions

Chez *C. roseus*, les cultures cellulaires ont constitué un outil intéressant dans l'étude du métabolisme des alcaloïdes indoliques pour deux raisons majeures :

- Ces cultures, maintenues en survie et soumises à un stress pH, ont présenté une forte excrétion de l'un des deux alcaloïdes majoritaires, l'ajmalicine. Elles ont alors permis d'appréhender les mécanismes d'accumulation de ces composés dans les cellules.
- Ces cultures, soumises à un stress biotique (présence d'un éliciteur), ont été capables de produire un composé de la voie de biosynthèse, la catharanthine, non dosé dans les conditions de culture classiques. Elles ont alors permis de montrer que la voie métabolique n'était pas altérée par le passage en culture *in vitro*, mais plutôt différemment régulée.

De même, les résultats obtenus sur plante entière sont intéressants car ils permettent de montrer l'importance des facteurs génétiques par rapport aux facteurs environnementaux sur la teneur en alcaloïdes des différents organes.

III. 3. METABOLISME DE L'AZOTE FIXE CHEZ LES ACACIAS SAHELIENS

Ce programme, initié en 1993, venait en appui au programme de Microbiologie développé par le Laboratoire de Microbiologie des Sols de l'IRD de Dakar (Sénégal) sur les symbioses plantes-microorganismes (3BC1 : Biotechnologies appliquées à la productivité végétale et à la valorisation des productions agro-industrielles, responsable Bernard Dreyfus).

Dans une démarche générale d'amélioration du rendement de la fixation d'azote chez les ligneux symbiotiques sahéliens, son but était de rechercher, au niveau du partenaire plante, les conditions favorables à l'expression d'une bonne capacité fixatrice lors de l'établissement de la symbiose entre les *Rhizobium*, bactéries fixatrices d'azote, et les *Acacia*. Ce volet d'étude venait compléter des travaux antérieurs du Laboratoire montrant que les acacias sahéliens, et plus particulièrement *Faidherbia albida*, présentaient un pouvoir fixateur souvent faible et toujours très variable, même en présence de souches bactériennes hautement fixatrices (Dommergues, 1995 ; Ndoye et al, 1995).

Ce programme a été développé en collaboration avec un étudiant sénégalais, Diégane Diouf, qui a réalisé un DEA et une thèse sous ma direction de 1993 à 1998. J'ai pu mettre en oeuvre de nombreuses techniques acquises lors d'un stage effectué à l'INRA de Versailles (Lab. du Métabolisme azoté, Pr Jean-François Morot-Gaudry) de 1990 à 1992. Tout au long de cette affectation à Dakar, j'ai travaillé en étroite collaboration avec cette équipe française mais également avec de nombreux chercheurs sénégalais de l'ISRA associés au Laboratoire de Microbiologie (M. Gueye) et des chercheurs-enseignants de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (I. Ndoye et MM. Spencer).

De plus, la Commission Scientifique n° 2 de l'IRD m'a confié l'organisation d'une réunion thématique sur les Acacias dont les actes ont été publiés (Campa et al, 1998).

III.3.1. Situation du sujet

Pour leur nutrition azotée, la plupart des végétaux puisent par leurs racines les sels ammoniacaux ou de nitrate issus soit de la minéralisation de l'azote organique par les microorganismes du sol, soit de l'apport d'engrais azotés. Contrairement aux ions nitrate et ammonium du sol, l'azote atmosphérique ne peut être incorporé que par des végétaux ayant contracté des symbioses avec des organismes procaryotes diazotrophes. Les associations les plus connues sont réalisées entre *Rhizobium* et certaines légumineuses ou entre *Frankia* et des plantes actinorhiziennes. Si le procaryote fournit à la plante l'azote sous forme d'ions ammonium grâce à l'activité de la nitrogénase, c'est en échange de l'apport, par la plante, d'une source carbonée indispensable à son développement.

C'est sous forme ammoniacale que l'azote provenant de la nutrition azotée classique ou symbiotique est alors directement incorporé, par la glutamine synthétase des racines, dans des molécules organiques de la plante, molécules qui

serviront au transfert du groupement azoté dans d'autres molécules organiques. Ces composés intermédiaires assurant le transport de la source azotée sont, chez les légumineuses symbiotiques, des amides (essentiellement asparagine et glutamine) ou des uréides (allantoïne et acide allantoïque). On sépare d'ailleurs les légumineuses symbiotiques en deux grands groupes selon leur mode de transport de l'azote fixé, les légumineuses tempérées se rangeant généralement dans le groupe des plantes à amides (Sprent, 1980) et les tropicales dans le groupe des plantes à uréides (Sinclair et Serraj, 1995).

A la création du programme, quelques données existaient sur des Acacias australiens (Hansen et Pate, 1987 ; Van Kessel et al, 1988), mais aucune étude n'avait porté sur le mode de transport de l'ammonium provenant de la fixation symbiotique ou même le métabolisme général de l'azote chez les Acacias des régions sahéliennes. Cette étude a donc constitué la première étape de notre programme de recherche portant sur l'amélioration du pouvoir fixateur d'azote des acacias sahéliens. Elle a été réalisée sur *Faidherbia albida* et trois autres espèces d'Acacia dont les aires de répartition au Sénégal dépendent de l'aridité.

Les Acacias sont des ligneux très utilisés dans le milieu paysan, souvent intégrés dans les programmes d'agroforesterie. On rencontre une douzaine d'espèces au Sénégal, réparties dans les différents profils édapho-climatiques du pays : domaine sahélien (200-600 mm de pluies annuelles), domaine soudanien (550-1350 mm) et domaine guinéen (1250-1350 mm). Traditionnellement, les Acacias, surtout en zone sahélienne, constituent une source de bois d'œuvre ou de feu ainsi que de fourrage aérien. Certains sont plus connus pour leur production de tanins, de gomme arabique ou pour leur usage en médecine traditionnelle. Mais leur aptitude à former des associations symbiotiques leur permettant d'assimiler l'azote atmosphérique et de le restituer au milieu les fait également utiliser dans le domaine agricole. Ainsi, *Faidherbia albida* (= *Acacia albida*) est souvent associé à différentes cultures traditionnelles (mil, arachide...) du domaine soudano-sahélien, assurant de meilleurs rendements non seulement pour ses capacités fixatrices d'azote mais aussi grâce à deux autres caractéristiques physiologiques. En effet, cet arbre possède une phénologie inversée, ce qui lui permet de fournir à la fois un ombrage pendant la saison sèche et une importante litière durant la saison des pluies. De plus, il possède une racine pivotante pouvant descendre jusqu'à 30 m de profondeur, près des nappes phréatiques. Utilisé par les paysans en culture intercalaire, il permet ainsi de participer à la restauration de la fertilité des sols sans entrer en concurrence avec les cultures associées.

Cependant, si *Faidherbia albida* forme facilement des nodosités en présence de bactéries de type *Bradyrhizobium* (Assefa et Kleiner, 1998), ces nodosités ne fournissent qu'une faible quantité d'azote à la plante (Dommergues, 1995). De plus, ce pouvoir fixateur est très variable (Sanginga et al, 1990 ; Ndoye et al, 1995) même entre populations issues du Sénégal (Gueye et al, 1997). Le niveau du potentiel fixateur d'azote est principalement dépendant de la souche bactérienne mais aussi de la plante-hôte et des facteurs

environnementaux tels que la disponibilité en azote, en carbone et en eau. Quant à sa variabilité, elle est généralement attribuée à l'origine géographique des graines et à leur diversité génétique, sans que des études précises aient été entreprises dans ce sens. Il est cependant établi que de par leur fort taux d'allogamie, les populations de *F. albida* d'Afrique de l'Ouest présentent un taux de polymorphisme et une diversité génétique très élevés (Joly et al, 1992). Aussi, la deuxième partie de notre projet a porté sur l'étude de l'impact de la diversité génétique et du facteur géographique sur la diversité de l'aptitude à fixer l'azote dans les populations sénégalaises de *F. albida*.

III.3.2. Accueil à l'INRA de Versailles

De 1990 à 1992, afin d'acquérir des compétences en physiologie moléculaire, j'ai été accueillie au Laboratoire de Nutrition et Métabolisme azoté de l'INRA de Versailles (Pr. JF. Morot-Gaudry), sous la direction de Bertrand Hirel. La problématique de cette équipe est axée sur l'étude des gènes codant les principales enzymes impliquées dans l'assimilation de l'azote fixé chez les plantes symbiotiques.

Nitrate et ammonium sont les deux sources minérales azotées utilisées par les végétaux supérieurs pour réaliser le métabolisme azoté. Seule la forme ammoniacale peut être incorporée dans les molécules organiques. Aussi, l'assimilation du nitrate nécessite deux étapes préliminaires de réduction pour sa transformation en ammonium : une première réduction en nitrite catalysée par la nitrate réductase (NR ; E.C. 1.6.6.1) suivie de la formation d'ammonium catalysée par la nitrite réductase (NiR ; E.C. 1.7.7.1). La dernière étape de l'assimilation de l'azote, commune aux deux sources minérales azotées, conduit à l'incorporation de l'ion ammonium dans des composés organiques par l'intermédiaire de deux réactions enzymatiques couplées, catalysées respectivement par la glutamine synthétase (GS ; E.C. 6.3.1.2) et la glutamate synthase (Fd-GOGAT ; E.C. 1.4.7.1). Ces enzymes participent à la synthèse de la glutamine et du glutamate, précurseurs des autres acides aminés et des nucléotides, nécessaires à l'élaboration des protéines et des acides nucléiques. Ce sont ces deux mêmes enzymes qui interviennent dans l'assimilation de l'ammonium fourni par les bactéries fixatrices d'azote lors du processus symbiotique. Lors de mon accueil dans le Laboratoire de Nutrition et Métabolisme azoté, l'essentiel du travail de recherche portait sur l'étude de ces deux enzymes. J'ai donc participé aux études sur la GS et la GOGAT, à la fois au niveau de la protéine (activité et nature des isoformes présentes dans les différents organes) et des gènes codant pour leur synthèse (isolement et expression dans des plantes témoins ou transformées) chez des légumineuses ou non.

III.3.3. Résultats

• III.3.3.1. Etude des voies d'assimilation de l'azote chez *Faidherbia albida*

Afin de définir les stratégies d'assimilation de l'azote développées par *F. albida*, il était nécessaire d'effectuer, dans un premier temps, le bilan des composés azotés présents dans les différents organes d'individus. Il a été réalisé sur des plantes à différents stades de croissance dans différentes conditions de culture : en absence ou en présence de *Bradyrhizobium*, en présence ou non d'une source d'N minéral et dans différentes conditions de culture (culture aseptique *in vitro*, culture en conditions hydroponiques ou culture en conditions contrôlées sous serre). Les différents composés azotés analysés ont été le nitrate, l'ammonium, les acides aminés, les amides et les uréides dont la concentration a été ramenée à la teneur en azote libre total. Pour chaque condition impliquant la présence de *Bradyrhizobium*, l'évaluation de la capacité fixatrice d'azote a été faite. De plus, pour la même expérimentation, l'évolution de l'activité de deux enzymes d'assimilation de l'azote minéral : nitrate réductase (NR) et glutamine synthétase (GS) a été suivie afin de situer spatio-temporellement le métabolisme de l'azote chez cette espèce.

Comparé aux autres ligneux tropicaux, le métabolisme azoté de *F. albida* est d'un type très particulier (Andrews, 1986). En effet, cette espèce accumule fortement le NO_3 dans les racines, les tiges et les feuilles (teneur voisine ou supérieure à $3 \mu\text{mol. g}^{-1}$ de matière sèche) et les activités NR et GS sont très faibles dans ces racines. Quelles que soient les conditions de culture (nutrition azotée minérale (NO_3 ou NH_4) ou NH_4 provenant de la fixation symbiotique), l'essentiel de l'assimilation de l'azote se déroule dans la feuille. Chez cette espèce, l'accumulation de NO_3 associée à une faible activité NR racinaire pourrait constituer une réponse adaptative de la plante aux carences possibles du milieu en nitrate (Campa et al, 2000).

De plus, les isoformes de la GS rencontrées dans les racines et les feuilles ne sont pas caractéristiques des espèces se développant en zone tropicale (Woodal et Forde, 1996). La GS des plantes supérieures est une protéine octamérique présente, dans les tissus chlorophylliens, sous deux isoformes : la GS_1 et la GS_2 , respectivement cytosolique et chloroplastique. La proportion de ces deux isoformes foliaires est variable selon les espèces (Mc Nally et al, 1983), le stade de développement des tissus et les saisons (Pearson et Ji, 1994). Chez les légumineuses tropicales non-papilionacées, les feuilles ont une activité GS_1 et GS_2 équivalente et les racines ne présentent pas d'activité GS_2 (Woodal et Forde, 1996). L'isolement et la purification partielle de la GS des feuilles de *F. albida* révèlent la présence de deux pics d'activité correspondant à 26 et 74% de l'activité GS totale. La révélation par immunoblotting (anticorps fournis par l'équipe de l'INRA de Versailles) permet d'assimiler le pic majoritaire d'activité à la GS_2 , et l'autre à la GS_1 , montrant un comportement particulier de *F. albida* par rapport aux plantes tropicales (Diouf et al, 2001). L'activité GS des racines est,

par contre, assurée en majorité par la GS_2 , comme décrit par Woodal et Forde (1996).

Une activité GS est également mesurée dans les nodosités. Attribuée à une autre isoforme, cette activité apparaît dès la formation des nodosités et augmente de façon considérable au cours de leur croissance. Chez *F. albida*, nous avons pu montrer que cette activité croissait lors du développement des nodosités et qu'elle était étroitement corrélée à l'activité nitrogénase de la bactérie, enzyme catalysant la transformation de l'azote atmosphérique en ammonium (Diouf et al, 2001). Cette particularité nous a permis d'utiliser l'activité GS nodulaire comme indicateur de l'activité fixatrice dans nos études portant sur des individus très jeunes, pour une sélection précoce. En fait, le niveau d'activité de la nitrogénase permet d'évaluer le pouvoir fixateur d'azote dans les techniques de mesure de l'activité réductrice d'acétylène (ARA) décrites par Hardy et al (1973). Mais cette technique s'appuie sur l'utilisation d'un chromatographe en phase gazeuse et demande une grande quantité de matériel végétal pour être rigoureuse. De même que les analyses en ^{15}N , elle n'était donc pas appropriée à notre matériel végétal. Nous nous sommes donc appuyés sur cette corrélation entre activité nitrogénase et activité GS nodulaire pour substituer la mesure de la GS nodulaire, effectuée par colorimétrie, à la mesure ARA pour évaluer (et non mesurer) le pouvoir fixateur d'azote dans notre étude de l'effet de la diversité génétique sur la capacité fixatrice de jeunes plants inoculés (Fig. 7).

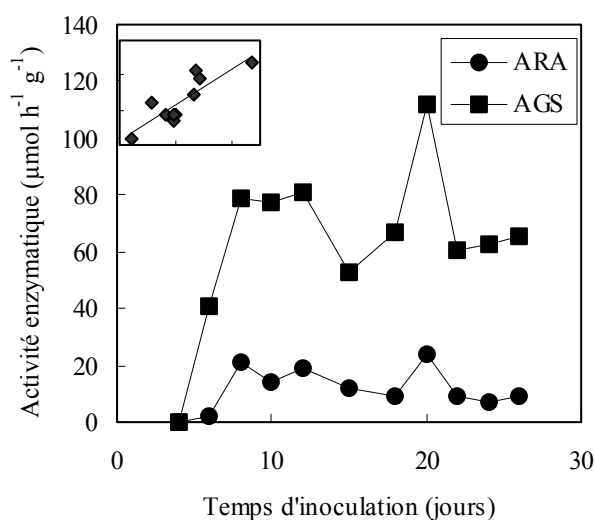


Figure 7. Activités nitrogénase (ARA) et glutamine synthétase (AGS) dans des nodosités de *F. albida* évaluées au cours de la croissance en tube Gibson. Chaque point représente la moyenne de cinq plantes pour GSA et de trois lots de trois plantes pour ARA.

La droite de régression est donnée en haut à gauche de la courbe ($y = 0,3126 x - 9,3199$; $R^2 = 0,755$).

En ce qui concerne le transport de l'azote fixé, *F. albida* a un comportement original par rapport aux légumineuses tropicales majoritairement étudiées : l'ammonium est incorporé dans des amides et non des uréides (Campa et al, 2000). Cette différence correspond vraisemblablement au fait que les plantes tropicales déjà décrites provenaient essentiellement de la famille des Phaséolées. De plus,

contrairement à *F. albida*, elles étaient généralement endémiques de zones tropicales humides, c'est-à-dire où la disponibilité en eau n'est pas un facteur limitant. Or, le transport de l'azote fixé sous forme d'uréides requiert un apport de molécules d'eau supérieur à celui nécessité par le transport sous forme d'amides. Il a par ailleurs été noté que quelques espèces tropicales fixatrices d'azote n'appartenant pas aux Phaséolées mais proches phylogénétiquement ou appartenant aux Acaciées (Aeschynoménées, Sesbaniées, Crotalariées) effectuaient le transport sous forme d'amides (Van Kessel et al, 1988 ; Yoneyama et Kondo, 1990). Ce métabolisme peut alors être décrit comme sur la figure 8.

L'ensemble des mécanismes conduisant au fonctionnement de la symbiose, que ce soit la formation des nodosités ou l'installation de l'activité fixatrice, est inhibé par la présence de nitrates dans le milieu de culture. Cette inhibition n'est pas directement reliée à la concentration en nitrate externe, mais à la teneur en nitrate dans les racines, celui-ci étant rapidement absorbé par les racines de la plante et accumulé (Diouf et al, 1998). La faible capacité de *F. albida* à fixer l'azote pourrait alors être en partie attribuée aux fortes concentrations racinaires en nitrate, inhibitrices du développement de la symbiose. La présence d'ammonium dans le milieu de culture n'a par contre aucun effet sur le niveau de la fixation d'azote.

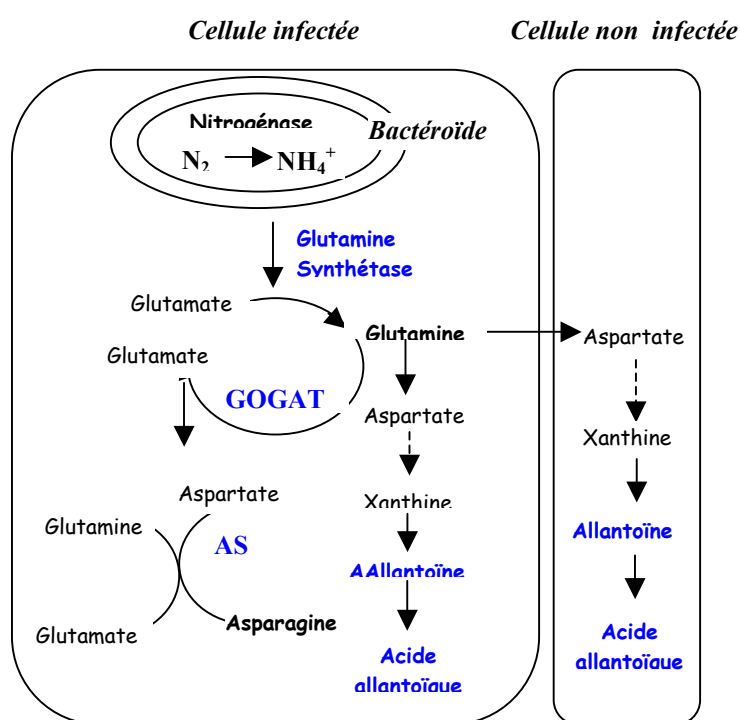


Figure 8. Métabolisme de l'azote fixé dans des cellules de racines de *Faidherbia albida* colonisées par des souches de *Bradyrhizobium* fixatrices d'azote. GOGAT : glutamate synthase; AS : asparagine synthase

- **III.3.3.2. Le métabolisme azoté d'autres Acacias sahéliens**

L'étude a été réalisée sur trois autres acacias provenant de zones géographiques différentes : *A. nilotica* (L.) Willd. ex Del. ssp. *tomentosa* (Benth), qui colonise les zones soumises aux inondations de la région soudano-guinéenne, *A. seyal* (Del.) var. *seyal* provenant de la zone soudano-sahélienne et *A. tortilis* (Forssk.) ssp. *raddiana* (Savi) inféodé à la zone sahélienne.

Ces trois espèces présentent un métabolisme de l'azote fixé identique à celui de *F. albida* : le transport de l'azote fixé est assuré sous forme d'amides. Suivant l'organe étudié, ces composés représentent entre 40 et 80% de l'azote libre total. Les espèces des zones arides (*A. seyal* et *A. tortilis*) présentent cependant, pour une inoculation réalisée dans les mêmes conditions (même souche bactérienne apportée à la même concentration), une activité fixatrice deux fois plus forte. Bien que, dans nos conditions expérimentales, toutes les espèces se développent sur le même sol, caractérisé par une concentration en nitrate et en ammonium respectivement de 1,3 et 0,11 mM, ces mêmes espèces provenant de zones arides présentent de plus faibles teneurs en eau et surtout de très faibles teneurs en nitrates. Dans les racines, le nitrate est à une concentration 5 à 10 fois inférieure à celle observée chez *F. albida* ou *A. nilotica* (Campa et al, 2000). L'effet négatif du nitrate à forte concentration dans les racines sur la fixation d'azote est souligné dans cette comparaison.

- **III.3.3.3. Influence de la diversité génétique sur la capacité fixatrice**

Si la capacité fixatrice de *F. albida* est faible, elle est également très variable (Sanginga et al, 1990 ; Ndoye et al, 1995), même entre populations issues du Sénégal (Gueye et al, 1997). Cette variabilité est généralement attribuée à l'origine géographique des graines et à la forte diversité génétique de l'espèce, sans que des études précises aient été entreprises pour le démontrer. Pour connaître l'impact de ces deux facteurs sur la diversité de réponse à la symbiose chez *F. albida*, nous avons récolté des graines, en les identifiant par rapport à leur pied-mère, dans quatre zones du Sénégal différant par leurs conditions climatiques et la densité des populations d'arbres, ce dernier paramètre pouvant intervenir sur le taux d'allogamie. Au total, 160 plantules (5 arbres par site, 8 plantules issues du même arbre) issues de la germination de ces graines dans des conditions de culture analogues (conditions identiques de sol, culture et inoculation) ont été retenues pour une analyse statistique (analyse de variances et analyse en composantes principales) sur des critères de croissance (hauteur de tige, masse fraîche des feuilles et des racines), de métabolisme azoté (activité glutamine synthétase des feuilles et des racines) et de capacité fixatrice d'azote (masse des nodosités et activité GS nodulaire).

On constate tout d'abord que la diversité inter-arbre au sein d'une zone géographique est aussi élevée que la diversité inter-zone géographique. Au sein des descendances, la diversité est cependant moins étendue dans la population des régions où la densité en *F. albida* est plus grande et la population plus âgée,

montrant que le fort taux d'allogamie pourrait bien être un des facteurs déterminant de la diversité.

Afin d'évaluer l'impact de l'origine géographique sur la capacité fixatrice, une analyse de variance portant sur l'ensemble de ces critères a été réalisée en tenant compte du descripteur géographique : site. Dans ce cas, seules la masse des racines et leur activité GS permettent d'établir des différences entre zones, avec cependant une contribution à la variance très faible (18 %).

Pour évaluer l'impact de l'origine géographique sur la capacité fixatrice, la même analyse a été réalisée en tenant compte du descripteur géographique : arbre de collecte. Dans ce cas, tous les paramètres, excepté l'activité GS des racines, interviennent de façon très significative dans la discrimination des graines.

Une analyse en composantes principales à l'aide de tous les paramètres met en évidence six facteurs indépendants qui expliquent 94% de la variabilité. Parmi eux, deux axes soulignent une bonne corrélation entre diversité génétique et capacité fixatrice (Diouf et al, 2001), indiquant que la réponse à la symbiose dépend plus de facteurs génétiques que climatiques.

L'analyse de cette diversité génétique a été envisagée à l'aide de marqueurs RAPD. Huit couples d'amorces ont été utilisés pour amplifier l'ADN de 44 individus (Diouf et al, 2001). Ils génèrent 173 bandes dont 143 sont polymorphes. Une analyse de variance de l'AGS nodulaire de ces individus montre que 35,5% des bandes sont liées à la capacité fixatrice d'azote. Sept d'entre elles, dont le marqueur 130, présentent un seuil de signification inférieur à 0,1% et peuvent être considérées comme des marqueurs de la fixation (Fig. 9). En effet, les individus ne présentant pas la bande ont une activité fixatrice faible, alors que 50% des individus ayant la bande ont une activité fixatrice forte. L'absence, dans le profil RAPD d'un individu cultivé en pépinière, d'une de ces 7 bandes permet alors de prédire un faible pouvoir fixateur pour l'arbre futur.

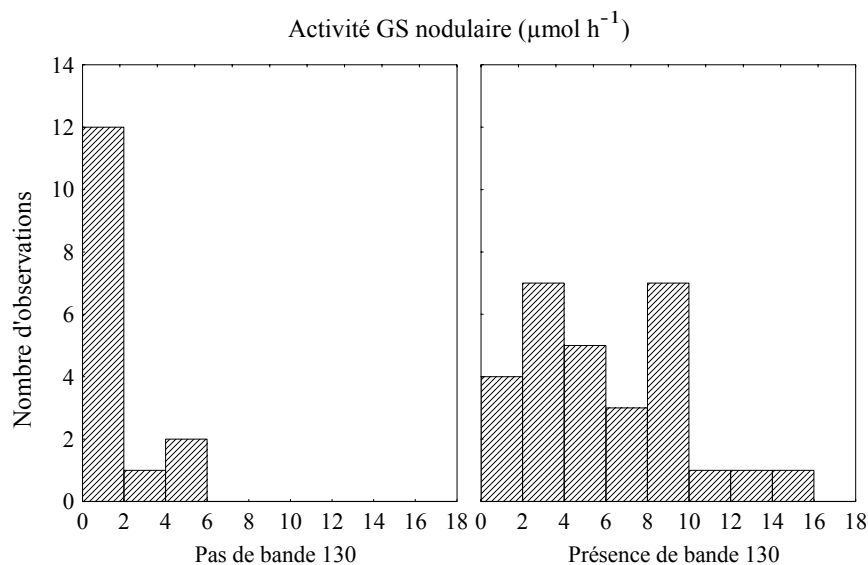


Figure 9. Répartition, en fonction de l'activité glutamine synthétase (GS) dans les nodosités, des *F.albida* présentant ou non le marqueur 130 lors de l'analyse RAPD.

III.4. METABOLISME DES ACIDES CHLOROGENIQUES CHEZ LES CAFEIERS

Ce travail a été initié en fin 1999 sur le centre IRD de Montpellier. Il s'inscrit dans le programme de l'équipe Génomique des caféiers formée par Michel Noirot. Actuellement gérée par Alexandre de Kochko, elle appartient à l'UMR DGPC (UR 141) dirigée par Serge Hamon et comporte trois grandes opérations. Le projet présenté ici fait partie de l'opération 3 intitulée : « Identification des gènes impliqués dans la qualité à la tasse du café. Amélioration du café Robusta » et s'intéresse plus particulièrement aux gènes impliqués dans la synthèse des acides chlorogéniques.

Pour sa réalisation, ce projet fait appel aux approches que j'ai déjà développées au cours de ma formation initiale (Biotechnologie et Physiologie cellulaires), aux bases de Biologie moléculaires acquises à l'INRA de Versailles et d'analyse de diversité génétique abordées sur *Acacia*. De plus, il intègre un volet de génomique fonctionnelle (isolement, caractérisation et expression de gènes) qui me permet d'acquérir de nouvelles compétences. Enfin, il vient en étroite collaboration avec le projet de génomique structurale (étude exhaustive des génomes tant pour ce qui est du nombre que de la séquence et de la disposition des gènes sur les chromosomes) développé dans notre équipe sur les caféiers.

Depuis sa création, ce projet a permis d'accueillir de nombreux stagiaires dont un étudiant en DEA (Claire Bertrand), un étudiant actuellement en dernière année de thèse (Mahesh Venkataramaiah) et un stagiaire post-doctoral, Nalapalli Samson, financé pendant 2 ans par contrat (CEFIPRA).

III.4.1. Situation du sujet

Les caféiers et la qualité du café

Le café, boisson connue depuis le VIII^{ème} siècle, est apprécié pour son goût et ses qualités stimulantes. La culture des caféiers a débuté au XIII^{ème} siècle sur le littoral éthiopien. Depuis le XVIII^{ème} siècle, à partir de quelques individus introduits dans les zones intertropicales des différents continents, cette culture n'a cessé de croître pour répondre à la demande des consommateurs.

Actuellement, deux espèces de caféiers sont majoritairement cultivées : *Coffea arabica* Linné et *C. canephora* Pierre, dont le café-boisson est commercialisé sous le nom respectivement d'Arabica et de Robusta. Outre leurs différences génétiques, ces deux espèces se différencient par leurs zones de culture et par le goût du café qui en est issu. L'Arabica, cultivé dans les zones montagneuses où la température peut descendre en dessous de 24°C, donne un café doux présentant une teneur en caféine plus faible que le Robusta. L'amertume et l'astringence plus marquées du Robusta ainsi que sa teneur plus importante en caféine en font un café moins apprécié des consommateurs. Son prix d'achat est d'ailleurs nettement moins élevé, faisant de l'amélioration de sa qualité organoleptique un objectif prioritaire pour les pays producteurs.

Les propriétés organoleptiques du café-boisson sont liées à la présence de plus d'un millier de molécules que l'on regroupe dans une vingtaine de familles. Selon la nature chimique du composé, sa présence dans la tasse lors de la dégustation peut ajouter une note positive ou négative au goût et à l'arôme du café. Ainsi, des composés tels que les lipides, les glucides ou un alcaloïde, la trigonelline, participent au « bon goût » du café. Par contre, la caféine ou les phénols, considérés comme principaux agents de la force, de l'amertume et de l'astringence du café, sont classés parmi les composés à effet négatif.

Certains de ces composés proviennent de la dégradation ou de la ré-association, lors de la torréfaction, de composés précurseurs présents dans le grain vert (terme employé pour désigner les grains avant torréfaction et obtenus après séchage du fruit). Ainsi, par leur dégradation en phénols (Leloup et al, 1995) les acides chlorogéniques (ACG) du grain vert participent au goût amer du café, apportant une touche négative à la boisson (Castle de Menezes et Clifford, 1987). Or, il a été montré que les ACG sont moins abondants dans les grains de café vert de l'Arabica que dans ceux du Robusta où ils peuvent représenter, chez certains individus, jusqu'à 12% de la matière sèche (Ky et al, 1999).

De plus, les ACG sont décrits comme des molécules pouvant se complexer avec la caféine. Sous forme de chlorogénates de caféine, piégés dans les vacuoles des fruits (Payen, 1846 ; Sondheimer et al, 1961), les ACG participeraient ainsi à l'accumulation de la caféine dans les grains de café. D'ailleurs, une corrélation a été observée entre les teneurs en ACG et en caféine dans le sous-genre *Coffea* (Anthony et al, 1993).

Les ACG ont également un rôle plus général dans la physiologie des plantes. Par leurs propriétés anti-oxydantes, ces composés sont souvent impliqués dans les mécanismes de résistance des plantes. Leur rôle exact n'est pas encore clairement déterminé. Ainsi, chez le tabac, les ACG pourraient être mobilisés pour participer à la synthèse de dérivés hydroxycinnamiques induite en réponse à une blessure (Maher et al, 1994). Ils interviendraient dans la protection contre les rayonnements UV (Grace et Logan, 2000) et dans la gestion du stress oxydatif provoqué par l'élicitation (Rice-Evans et al, 1997). De plus, ces composés sont maintenant considérés comme des formes de réserve de dérivés de l'acide cinnamique pour la lignification (Schoch et al, 2001 ; Hoffmann et al, 2004).

Toujours grâce à leur activité anti-oxydante, les ACG présentent également un intérêt pour la santé humaine. Leur présence au niveau du tractus digestif pourrait prévenir des risques de cancer (Niggeweg et al, 2004) et des analogues de structure ont démontré un puissant pouvoir anti-viral (King et al, 1999).

Bien qu'intervenant de façon négative dans la qualité organoleptique du café, les ACG apparaissent donc comme des métabolites secondaires dont la synthèse peut présenter un grand intérêt et l'étude de leur voie de biosynthèse chez les caféiers dépasse le simple cadre de l'amélioration du Robusta.

Déterminants moléculaires de la biosynthèse des ACG

Les ACG sont des composés dont la synthèse dépend de la voie des phénylpropanoïdes qui conduit à la production d'un grand nombre de composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les phytoalexines, les coumarines et les lignines (Hahlbrock et Scheel, 1989). Ils sont obtenus par estérification des acides hydroxycinnamiques provenant de cette voie avec, généralement, l'acide quinique ou shikimique. Leur synthèse débute par une désamination de la phénylalanine par la phénylalanine ammonia-lyase (PAL). Elle suit alors la voie des phénylpropanoïdes qui est considérée, chez de nombreux modèles végétaux, comme étant régulée par cette enzyme (Bates et al, 1994).

Au sens strict, seul l'acide 5-caféoyl quinique (5-CQA), l'ester le plus fortement représenté dans le règne végétal, est appelé acide chlorogénique. La formation de ce 5-CQA est bien documentée, depuis que des travaux récents sur des plantes modèles telles que *Arabidopsis*, la tomate ou le tabac ont montré son implication dans la synthèse des lignines et dans la réponse aux stress (Schoch et al, 2001 ; Niggeweg et al, 2004; Hoffmann et al, 2004). Le caféoyl-CoA et l'acide p-coumaroyl quinique seraient deux intermédiaires indispensables à la synthèse du 5-CQA, par estérification du premier ou hydroxylation du second.

Intérêt de l'étude du métabolisme des ACG chez les caféiers

L'étude des ACG présente un intérêt supplémentaire chez les caféiers dans le sens où, chez ces plantes, en plus de leur rôle classique de composés anti-oxydants, ils sont considérés comme intervenants dans la qualité du café-boisson.

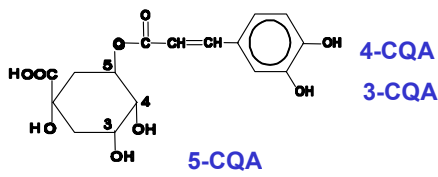
Mais l'intérêt majeur réside dans le fait que, chez ces plantes, le métabolisme des ACG est très diversifié. En effet, même si le 5-CQA est l'ester quinique majoritaire, d'autres dérivés quiniques existent, tous regroupés sous le terme « acides chlorogéniques » ou ACG.

Trois classes de composés sont représentées et constituent plus de 95% de la totalité des ACG (Fig. 10):

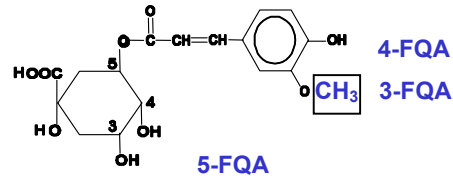
- les acides caféoylquiniques (3-, 4- ou 5-, suivant la position du caféate sur le quinate),
- les acides féruloylquiniques (3-, 4- ou 5-FQA) et
- les acides dicaféoylquiniques (3,4-, 3,5- ou 4,5-DiCQA).

De plus, le complexe d'espèces des caféiers est très vaste. Bien qu'essentiellement deux espèces soient cultivées, le genre comprend plus de 80 espèces (ou taxons) sauvages. Si ces espèces présentent une forte diversité phénotypique, l'évaluation des teneurs en ACG pour une vingtaine d'entre elles a montré qu'il existe également une forte variabilité non seulement dans les teneurs accumulées dans les grains verts, mais aussi dans la nature des isomères majoritaires présents (Anthony et al, 1993). La compréhension des mécanismes de synthèse des ACG peut ainsi s'appuyer sur les ressources génétiques du genre *Coffea*.

Les acides caféoylquiniques (CQA)



Les acides féruloylquiniques (FQA)



Les acides dicaféoylquiniques

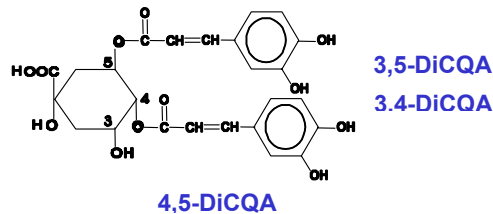


Figure 10. Acides chlorogéniques majeurs présents dans les grains de café verts.

Enfin, il semblerait que la qualité de la boisson soit plus dépendante du rapport des teneurs en CQA et DiCQA que du contenu total en ACG (Ohiokpehai et al, 1982). Aussi, les voies de biosynthèse de ces différents isomères méritent d'être étudiées.

D'après les données bibliographiques, un schéma de biosynthèse général peut être proposé pour les caféiers (Fig. 11).

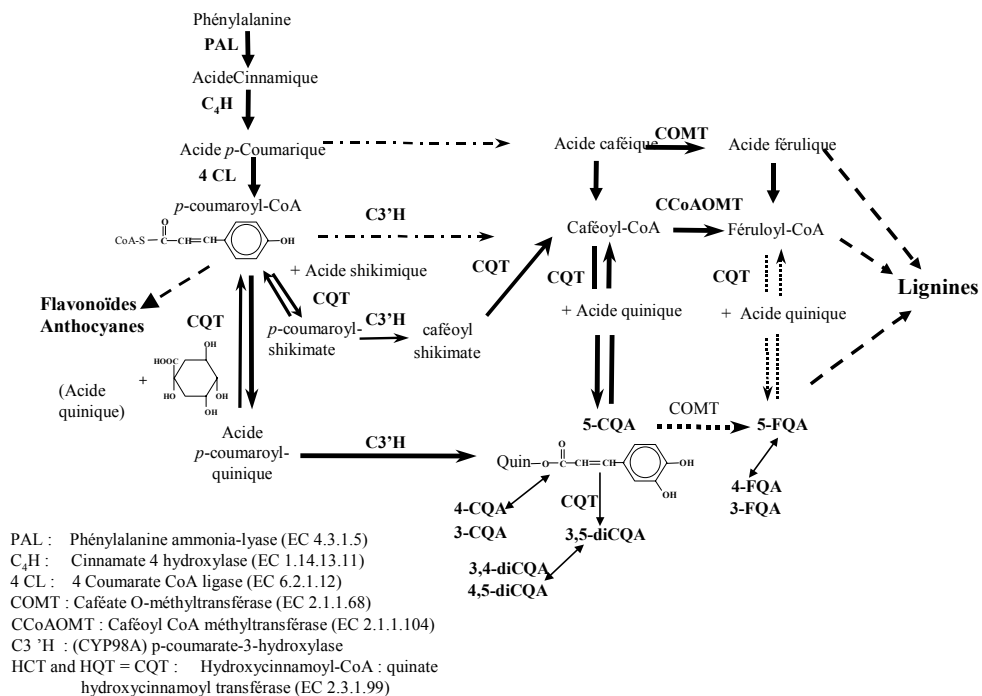


Figure 11. Voies de biosynthèse probables des acides chlorogéniques chez les caféiers.

III.4.2. Projet de recherche initial

Le projet tel qu'il a été soumis en 1999 proposait de participer à l'amélioration de la qualité du Robusta en limitant l'accumulation des ACG dans les grains verts. Cependant, on sait que les ACG constituent un réservoir important de phénols pouvant être rapidement mobilisés pour répondre aux agressions phytopathogènes, aux blessures et aux stress oxydatifs (Maher et al, 1994 ; Mc Keehen et al, 1999). La limitation de leur production dans la plante entière pourrait entraîner une diminution des capacités de la réponse aux agressions. La teneur en ACG devait donc être réduite uniquement dans les grains. Pour obtenir *in fine* un Robusta présentant des teneurs en composés phénoliques faibles grâce à des teneurs en ACG diminuées uniquement dans le grain de *C. canephora*, l'une des stratégies proposées était la transformation génétique. Les constructions géniques seraient alors basées sur l'emploi d'un promoteur « grain- ou fruit-spécifique », susceptible de diriger l'expression d'une séquence pouvant inhiber ou réduire l'expression du gène-candidat (gène appartenant à la voie de biosynthèse des ACG) uniquement dans le grain ou le fruit.

Pour jeter les bases de ce travail reposant sur une approche gène-candidat, trois études préliminaires étaient indispensables.

Tout d'abord, il fallait développer des techniques de transformation des caféiers utilisables au niveau du laboratoire pour déterminer les réelles fonctions des gènes-candidats retenus.

Ensuite, il s'agissait de mettre en évidence les espèces de caféiers intéressantes pour leur niveau de teneur en ACG. En élargissant le nombre d'espèces et de composés secondaires analysés dans des études antérieures, cet inventaire devait permettre de déceler les espèces présentant les situations les plus contrastées uniquement pour leur teneur en ACG, afin de les utiliser dans des études de diversité (de séquence ou de régulation) ou pour la création de banques soustraites.

Enfin, pour adapter la technique gène-candidat à l'étude de la voie de biosynthèse des ACG chez les caféiers, il était nécessaire de connaître la voie de biosynthèse telle qu'elle était décrite chez d'autres plantes pour :

- mettre en évidence les enzymes-clés ;
- rechercher et caractériser les gènes codant pour leur synthèse ;
- connaître l'implication réelle du gène dans la biosynthèse des ACG.

Seuls les gènes majeurs, c'est-à-dire se révélant fortement impliqués dans la biosynthèse, seront retenus pour être utilisés dans les constructions géniques pour la transformation des caféiers. Leur degré d'implication dans la biosynthèse s'appuiera, dans un premier temps, sur des études de co-localisation avec des QTL de teneur en ACG du grain déjà positionnés par l'équipe dans le croisement entre les espèces *C. pseudozanguebariae* et *C. liberica* var. *Dewevrei* (Ky, 2000). Leur validation sera réalisée par transformation de mutants d'insertion d'*Arabidopsis*.

III.4.3. Résultats

• III. 4.3.1. Techniques de transformation génétique

Une partie de ce programme a fait l'objet de la recherche de Nalapalli Samson (allocation post-doctorale), financée par un contrat CEFIPRA (Centre Franco-Indien pour la Promotion de la Recherche Avancée) dont je suis co-rédactrice.

Les techniques de transformation classiquement utilisées pour les caféiers utilisent des cultures d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la construction et mises au contact de cals embryogènes (Carneiro, 1997 ; Leroy et al, 1997). Adaptées essentiellement aux espèces cultivées, elles nécessitent un long temps de culture et fournissent de faibles rendements. De plus, les gènes de sélection introduits dans la construction sont des gènes de résistance aux herbicides, le chlorsulfuron ® (Dupont), dont l'emploi est très contesté pour des raisons environnementales. La technique nécessite donc d'être améliorée.

Nos études ont tout d'abord porté sur la mise au point de milieux de culture permettant d'obtenir des cals embryogènes dans un temps relativement court (classiquement, pour les espèces cultivées, 7 à 8 mois sont nécessaires depuis l'explant jusqu'à la formation des embryons) et pour quelques espèces sauvages, peu étudiées jusqu'alors.

Dans ce but, à partir des milieux classiquement utilisés (Berthouly et Michaux-Ferrière, 1996), des modifications de teneurs en azote minéral et hormones de croissance ont été effectuées dans le premier milieu de culture. Ces modifications permettent non seulement de diminuer d'environ 2 mois la durée de culture, mais également d'appliquer les techniques d'embryogenèse somatique aux espèces sauvages (Samson et al, soumis).

Pour la transformation, deux gènes de sélection positive ont été testés. Le gène de la mannose isomérase n'a pu être retenu car les caféiers sont capables d'assimiler le mannose sans être transformés. Par contre, des premiers essais semblent montrer que le gène de la xylose isomérase (*xy/A*), qui catalyse l'isomérisation du xylose en sucre simple (xylulose) assimilable par les plantes, serait un bon outil pour la sélection positive (Samson et al, 2004) : son introduction dans le génome des cellules de cals embryogènes permet la croissance des embryons et leur régénération sur un milieu appauvri en source carbonée classique.

La poursuite de ce travail est assurée par un chercheur post-doctorant indien placé sous la direction conjointe d'A. de Kochko et moi-même.

• III. 4.3.2. Analyse de la diversité interspécifique

Si seulement deux espèces sont particulièrement exploitées pour leurs grains, il existe au moins 80 espèces (ou taxons) sauvages dans le genre *Coffea*, distribuées en Afrique, dans la région des forêts intertropicales, de l'Ethiopie jusqu'en Côte d'Ivoire. Pour quelques-unes d'entre elles, le contenu des grains en trigonelline (Mazzafera, 1991), caféine et acides chlorogéniques (Anthony et al,

1993 ; Ky et al, 2001) ou sucres (Chabrilange et al, 2000) a été analysé. Dans cette étude, le contenu des grains verts en ces quatre familles de composés a été évalué selon des protocoles mis au point au Laboratoire (Ky, 2000) sur *C. canephora* et 20 espèces (ou taxons) sauvages anciennement maintenues à la Station expérimentale de Man (Côte d'Ivoire).

En ce qui concerne les sucres, il est intéressant de noter que toutes les espèces ne renferment qu'un seul composé majeur : le saccharose. De plus, ces teneurs évoluent de façon continue de 3,8 % à 10,1 % de la matière sèche selon les espèces (MS). Cette même observation est faite pour la trigonelline, dont les valeurs varient de 0,39 à 1,77 % MS (Campa et al, 2004).

Par contre, en ce qui concerne les teneurs en caféine et en ACG, la diversité interspécifique est structurée en différents groupes.

Pour la caféine, les teneurs sont réparties dans quatre groupes bien distincts et vont de 0 % (pour quatre espèces sauvages dont *C. pseudozanguebariae*) à 2,64 % MS chez *C. canephora* (Campa et al, 2005). Trois groupes ont des moyennes nettement inférieures à celles du groupe de *C. canephora* et l'un d'eux correspond à celui déjà décrit comme regroupant les espèces dites « sans-caféine ». Il faut cependant noter que des traces de caféine ont été mises en évidence chez certains individus appartenant pourtant à ces espèces « sans-caféine ». Si les espèces d'Afrique de l'Ouest appartiennent toutes au groupe ayant les plus fortes teneurs en caféine, les espèces d'Afrique de l'Est sont réparties dans les trois autres groupes. Par contre, les espèces d'Afrique centrale sont distribuées dans tous les groupes, deux d'entre elles, *C. sp* Bakossi et *C. canephora*, constituant les valeurs les plus extrêmes.

Pour les ACG, les teneurs varient de 0,8 % chez *C. sp* Bakossi à 11,9 % MS chez *C. sp* N'Koumbala, deux taxons originaires d'Afrique centrale. Comme pour la caféine, cet élément semble indiquer que l'Afrique centrale serait un des centres de diversité des caféiers. Les valeurs sont réparties en trois groupes, la majeure partie des espèces d'Afrique de l'Est faisant partie des deux groupes aux moyennes les plus faibles. Comme pour la caféine, les espèces d'Afrique de l'Ouest sont essentiellement dans le groupe aux fortes teneurs. Ainsi, les espèces à forte teneur en ACG présentent également de fortes teneurs en caféine. Par contre, les espèces à faible teneur en ACG accumulent peu ou pas du tout la caféine (Campa et al, sous presse).

L'analyse de l'ensemble des résultats met en évidence un taxon dont les caractéristiques sont très éloignées de *C. canephora* : *C. sp* Bakossi (Tab. 4). Il pourrait être utilisé dans des études de comparaison de niveau d'expression des gènes contrôlant les différentes voies de biosynthèse des composés étudiés. Des études comparatives pourraient aussi être envisagées avec deux espèces, *C. pseudozanguebariae* et *C. stenophylla*, pour lesquelles seules les teneurs en caféine et ACG sont très différentes.

Les teneurs des différentes isoformes d'ACG ont également été évaluées et permettent de discriminer trois types d'espèces :

- Les espèces accumulant essentiellement des CQA (plus de 90 % des ACG chez *C. eugenioïdes* et *C. pocsii*)
- Les espèces accumulant à teneur équivalente des CQA et des DiCQA (*C. sp* Moloundou)
- Les espèces accumulant CQA, DiCQA et FQA (respectivement 70, 20 et 10% chez *C. sp* Congo).

C. sp Moloundou et *C. sp* Congo pourraient être utilisées pour étudier les voies de biosynthèse des différents ACG.

Tableau 4. Teneurs en acides chlorogéniques totaux, caféine, trigonelline et saccharose dans les grains verts de différentes espèces sauvages.

| Espèces | Teneurs (% dmb) | | | |
|------------------------------|-----------------|---------|--------------|------------|
| | ACG | Caféine | Trigonelline | Saccharose |
| <i>C. sp</i> Bakossi | 0,79 | 0,00 | 0,66 | 3,81 |
| <i>C. humblotiana</i> | 1,00 | 0,00 | 0,81 | 5,73 |
| <i>C. pseudozanguebariae</i> | 1,47 | 0,00 | 1,02 | 7,95 |
| <i>C. salvatrix</i> | 2,18 | 0,03 | 1,16 | 8,96 |
| <i>C. eugenioïdes</i> | 5,17 | 0,51 | 1,33 | 7,70 |
| <i>C. racemosa</i> | 5,33 | 1,05 | 1,02 | 6,44 |
| <i>C. sp</i> Moloundou | 5,55 | 0,58 | 1,59 | 5,68 |
| <i>C. heterocalyx</i> | 6,25 | 0,92 | 1,53 | 6,22 |
| <i>C. liberica dewevrei</i> | 7,62 | 0,94 | 0,56 | 5,33 |
| <i>C. stenophylla</i> | 8,23 | 2,27 | 1,09 | 7,50 |
| <i>C. congensis</i> | 8,44 | 1,47 | 1,06 | 6,06 |
| <i>C. humilis</i> | 8,65 | 1,93 | 0,52 | 6,89 |
| <i>C. liberica Koto</i> | 8,85 | 1,31 | 0,39 | 5,86 |
| <i>C. sp</i> Congo | 9,26 | 2,27 | 1,75 | 5,16 |
| <i>C. kapakata</i> | 9,71 | 1,20 | 1,77 | 7,51 |
| <i>C. liberica liberica</i> | 9,80 | 1,24 | 0,67 | 8,28 |
| <i>C. pocsii</i> | 10,65 | 1,27 | 1,45 | 10,13 |
| <i>C. sp</i> Ngongo 2 | 10,77 | 2,13 | 1,13 | 4,34 |
| <i>C. brevipes</i> | 11,13 | 2,54 | 1,35 | 4,68 |
| <i>C. canephora</i> | 11,34 | 2,64 | 0,82 | 6,10 |
| <i>C. sp</i> N'koumbala | 11,90 | 2,36 | 1,20 | 5,22 |

• III. 4.3.3. Recherche de gènes candidats

Cette étude préliminaire a été ciblée vers des gènes de la voie des phénylpropanoïdes sur lesquels de très nombreux travaux ont été réalisés : les gènes codant pour la première enzyme de la voie des phénylpropanoïdes, la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) et pour deux O-méthyltransférases, la caféate- O-méthyltransférase (COMT) et la caféoyl-CoA-O-méthyltransférase (CCoAOMT). Certains gènes de la voie, comme ceux codant pour la PAL, appartiennent à des familles multigéniques qui nécessitent la recherche préalable des différents orthologues.

Pour les gènes PAL, les analyses de séquences de deux banques EST (Expressed-Sequence Tag) disponibles dans l'équipe, l'une obtenue à partir de jeunes feuilles et l'autre à partir d'un mélange de fruits à différents stades de maturation, ont indiqué qu'au moins trois gènes différents codant pour la PAL sont

exprimés dans les fruits de *C. canephora*. La pleine longueur de la partie codante de deux d'entre eux a été isolée soit par criblage de la banque d'ADNc de fruits (*pF6*, accession n° AF460203) soit par analyse des séquences EST. Les gènes *PAL1* et *PAL2* codent respectivement pour des polypeptides de 717 et 711 acides aminés. Ces protéines ont une masse moléculaire déduite, respectivement, de 77,9 et 77,2 kDa, correspondant aux tailles déterminées pour des polypeptides de PAL d'autres plantes (72-83 kDa). Les séquences dérivées d'acides aminés contiennent les motifs conservés rencontrés dans les autres séquences PAL, en particulier le site actif de la PAL : G-[STG]-[LIVM]-[STG]-[AC]-S-G-[DH]-L-x-P-L-[SA]-x(2)-[SAV]. Ces séquences *PAL1* et *PAL2* présentent seulement 84,6% de similarité entre elles et les séquences génomiques correspondantes diffèrent légèrement, particulièrement dans la taille des parties UTR (3' et 5') et des introns (1800 et 1000 pb respectivement).

Pour la *COMT*, une pleine longueur de la partie codante d'un gène *COMT* a été isolée par criblage de la banque ADNc de fruits avec une sonde homologue. Son ORF se compose de 1053 nucléotides et code pour une protéine de 350 acides aminés. La présence d'un intron d'environ 700 pb près de l'extrémité 5' a été mise en évidence par analyse de l'ADN génomique.

Pour la *CCoAOMT*, l'analyse des séquences EST montre qu'au moins un gène *CCoAOMT* est exprimé dans les fruits de *C. canephora*. La partie codante de ce gène est de 744 pb et code pour une protéine de 247 acides aminés. L'analyse de l'ADN génomique montre la présence d'un intron de 500 pb.

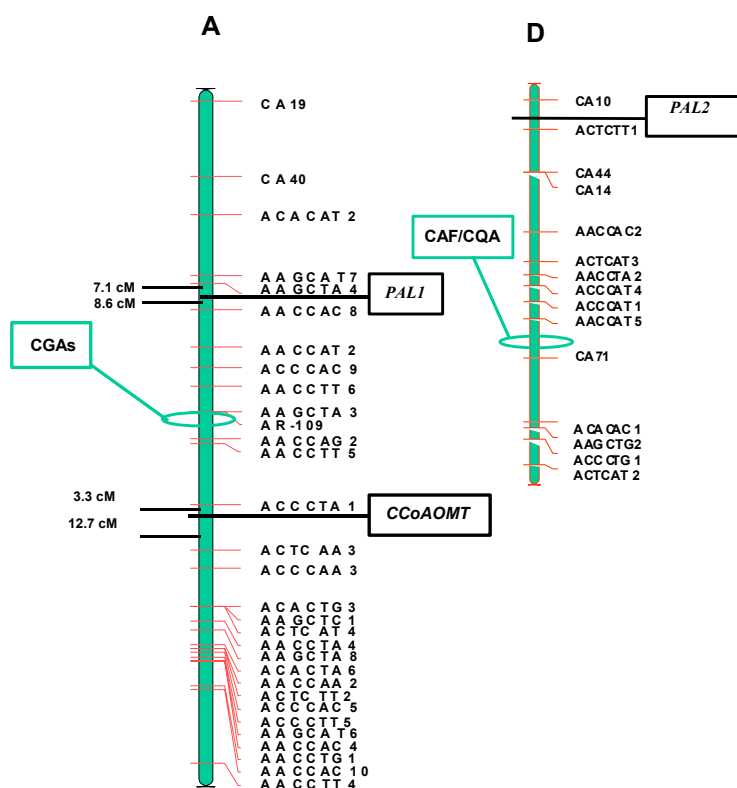


Figure 12. Groupes de liaison A et D d'une carte génétique (PSE X DEW) X DEW montrant la position des gènes *CCoAOMT*, *PAL1* et *PAL2* et de deux QTL relatifs au contenu en ACVG des fruits (CGAs: contenu total en CGAs; CAF/CQA : rapport du contenu en caféine et 5-CQA).

Une cartographie génétique préliminaire des gènes *PAL1*, *PAL2* et *CCoAOMT* a été réalisée en utilisant la descendance backcross d'un croisement entre *C. canephora* (CAN) et *C. pseudozanguebariae* (PSE).

Elle montre que les gènes *PAL1* et *CCoAOMT* sont positionnés sur le même groupe de liaison (groupe A). Un QTL relatif au contenu en acides chlorogéniques du fruit et mis en évidence par l'équipe (Ky, 2000) est également situé sur ce groupe de liaison, entre les deux gènes (Campa et al, 2003). *PAL2* est situé sur le groupe de liaison D (Fig. 12). Dans la descendance, les backcross hétérozygotes ayant l'allèle PSE pour *PAL1* et *CCoAOMT* présentent une diminution de leur contenu en ACG égale à 15 et 11%, respectivement, comparée à la descendance homozygote pour l'allèle DEW. Ceci tend à montrer que les gènes *PAL1* et *CCoAOMT*, contrairement au gène *PAL2*, ont un effet sur la teneur en ACG du grain vert. Cependant, leur effet est relativement faible.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette faible implication des gènes étudiés :

- la co-localisation avec des QTL n'est pas un outil performant pour valider les gènes et doit être suivie d'une étude de transformation de mutants d'insertion à l'aide des gènes *PAL1* et *CCoAOMT* ;
- ces gènes, bien que codant pour des enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, ne conduisent pas qu'à la synthèse des ACG, contrairement à ceux codant pour les hydroxylases ou les estérases catalysant les dernières étapes de la synthèse. Les gènes-candidats doivent donc être recherchés dans une partie plus en aval dans la voie de biosynthèse ;
- la biosynthèse des ACG est certainement, comme celle d'autres phénylpropanoïdes, sous la dépendance de gènes de régulation ;
- la teneur en ACG dans le fruit peut ne pas être uniquement liée à leur biosynthèse au sein de cet organe, cette accumulation pouvant dépendre d'un ralentissement de leur catabolisme (Matsuda et al, 2003) ou de leur transport depuis un autre organe.

Ces premières conclusions m'ont conduite à modifier le projet de recherche initial et à proposer de nouvelles perspectives regroupées dans trois grands axes et présentées dans le chapitre suivant.

III.4.4. Perspectives de recherche

Métabolisme des acides chlorogéniques chez les caféiers

1. Etude de la voie de biosynthèse :

Isolement et caractérisation de nouveaux gènes-candidats

Les premiers résultats obtenus sur les gènes *PAL* et *CCoAOMT* tendent à montrer que ces gènes ne sont que très faiblement impliqués dans les teneurs en acides chlorogéniques observées dans le fruit. Deux raisons majeures peuvent être invoquées :

- les gènes étudiés dans cette première partie du travail codent pour des enzymes qui se situent en amont des étapes finales de synthèse des *ACG*, sur une partie de la voie commune aux phénylpropanoïdes. Leur fonction n'étant pas de produire exclusivement des *ACG*, leur implication dans les teneurs en *ACG* peut être ainsi masquée ;
- il a été montré que la plupart des gènes de la voie des phénylpropanoïdes, et particulièrement ceux codant pour la *PAL*, appartiennent à des familles multigéniques et qu'ils codent pour des isoenzymes dont la régulation ou les spécificités de substrat sont différentes (Lois et al, 1989 ; Health et al, 1998 ; Martz et al, 1998). Les gènes isolés ici ne sont peut-être pas les représentants de ces familles multigéniques les plus impliqués dans la biosynthèse des *ACG*.

Deux grandes directions sont donc envisagées dans la recherche de gènes candidats.

1/ Recherche de gènes codant pour de nouvelles enzymes

Tout d'abord, il s'agira de continuer la recherche d'autres gènes de fonction également impliqués dans la voie (gènes aux fonctions similaires ou différentes) mais intervenant dans les étapes ultimes de la biosynthèse des *ACG* : hydroxylation, estérification, ainsi que dans les étapes conduisant à la synthèse des différents isomères (méthylation, double estérification...).

L'estérification finale qui conduit à la synthèse des acides chlorogéniques est assurée par des hydroxycinnamoyl-CoA : hydroxycinnamoyl quinate transférases. Ces enzymes aux activités réversibles catalysent l'estérification du *p*-coumaroyl-CoA avec le quinate ou le shikimate et du caféoyl-CoA uniquement avec le quinate. Originellement, une seule enzyme, nommée *CQT*, était décrite pour assurer l'estérification des différents composés. Depuis peu, il a été démontré que deux différentes enzymes, la *HCT* (Hoffmann et al, 2004) et la *HQT* (Niggeweg et al, 2004) se partagent cette fonction chez les plantes modèles. L'analyse des banques EST de fruits établies par l'équipe a permis d'identifier un gène codant pour chacune de ces protéines chez *C. canephora*. L'isolement et le séquençage des parties codantes complètes est en cours.

L'hydroxylation est catalysée par la *p*-coumarate-2-hydroxylase (*C3'H*). Cette cytochrome P450 (groupe des *CYP98A*) est une enzyme microsomale qui peut

hydroxyler le coumaroyl-quinone ou -shikimate, mais aussi l'acide *p*-coumarique ou le *p*-coumaroyl-CoA. Chez *C. canephora*, deux plines longues d'ADNc de *C3H* ont été isolées en utilisant la stratégie CODEHOP (Rose et al, 1998) et le criblage par PCR de la banque ADNc de fruits. Ces gènes codent tous les deux pour une protéine de 508 acides aminés, mais ces protéines montrent seulement 75% d'identité entre elles. L'étude de l'expression de chacun de ces gènes dans des levures est en cours de réalisation au Laboratoire de Génomique fonctionnelle des Cytochromes P450 des plantes (Département des Réponses Métaboliques des Plantes, IBMP-CNRS de Strasbourg).

L'isolement de ces gènes est envisagé en utilisant la stratégie gène-candidat spécifique telle qu'elle a déjà été développée pour les gènes de PAL, de COMT et de CCoAOMT.

Pour des gènes intervenant dans la biosynthèse de composés très spécifiques des caféiers, tels que les différents groupes d'ACG, leur isolement pourra être réalisé à l'aide de banques soustraites entre espèces ayant des profils de contenu en ACG très différents (cf III.4.3.2). Cette approche « en aveugle », est basée sur la recherche de marqueurs discriminants entre espèces (ou entre organes). La recherche de marqueurs discriminants peut être effectuée par comparaison de profils de protéines (comparaison de profils d'électrophorèses bidimensionnelles) ou d'ADNc (mise en évidence lors du criblage de banques EST) issus d'espèces différentes (ou de différents organes de la même espèce). Dans le cas des protéines, les marqueurs seront microséquencés afin de synthétiser des amorces nucléotidiques. Dans le cas des ADNc, le séquençage des marqueurs conduira également à la synthèse d'amorces aboutissant à l'isolement de gènes.

2/Recherche d'orthologues dans la cas de familles multigéniques

Ensuite, dans un optique d'analyse de diversité génétique et fonctionnelle, il s'agira de déterminer le nombre réel de gènes appartenant à chacune des familles multigéniques et la spécificité des isoenzymes pour lesquelles ils codent.

Lorsque plusieurs substrats peuvent être utilisés par l'enzyme, la fonction précise de chaque gène sera définie en réalisant une étude des substrats préférentiels de la protéine recombinante obtenue par expression, dans une bactérie ou levure, du gène isolé chez les caféiers. Dans un deuxième temps, il sera envisagé de diminuer leur expression chez des plantes modèles (*Arabidopsis*, tabac) ou des caféiers en utilisant la stratégie antisens ou RNAi.

Pour les familles multigéniques codant pour des protéines acceptant un substrat unique (e.g. la PAL), il s'agira de connaître le nombre de copies du gène existant chez les caféiers. Puis, à partir des séquences d'ADNc partielles ou complètes mises en évidence dans les banques EST, il sera possible de dessiner des amorces spécifiques de chaque gène et d'étudier leur profil d'expression par RT-PCR. Enfin, leur mode de régulation devra être étudié.

Dans tous les cas, l'expression de chacun des gènes sera suivie dans les différents organes de la plante par Northern blot ou RT-PCR.

En utilisant le croisement entre les espèces *C. pseudozanguebariae* et *C. liberica* var. Dewevrei, il sera possible de positionner ces gènes sur des groupes de liaison et de vérifier leur éventuelle co-localisation avec des QTL de teneur en ACG du grain déjà positionnés. Leur rôle dans les teneurs en ACG sera d'abord étudié en utilisant des mutants d'insertion d'*Arabidopsis* avant de réaliser des transformations sur caféiers.

2. Etude de la régulation des gènes de la voie de biosynthèse

Certains gènes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, et particulièrement ceux codant pour la PAL, sont exprimés en conditions de stress. Ainsi, chez le pois, deux des trois gènes *PAL* présents sont inductibles par blessure, alors qu'un seul est induit à la fois par blessure et par application d'éliciteur fongique (Cramer et al, 1989).

D'autre part, à l'aide de plants transgéniques de tabac sous-exprimant la Rubisco, il a également été montré que le métabolisme des phénylpropanoïdes et des alcaloïdes tels que la nicotine pouvait être altéré, montrant la dépendance du métabolisme secondaire par rapport au métabolisme primaire (Matt et al, 2002). A partir de ce modèle, il pourrait être intéressant de regarder, chez les caféiers, le rôle joué par la photosynthèse sur les teneurs en ACG.

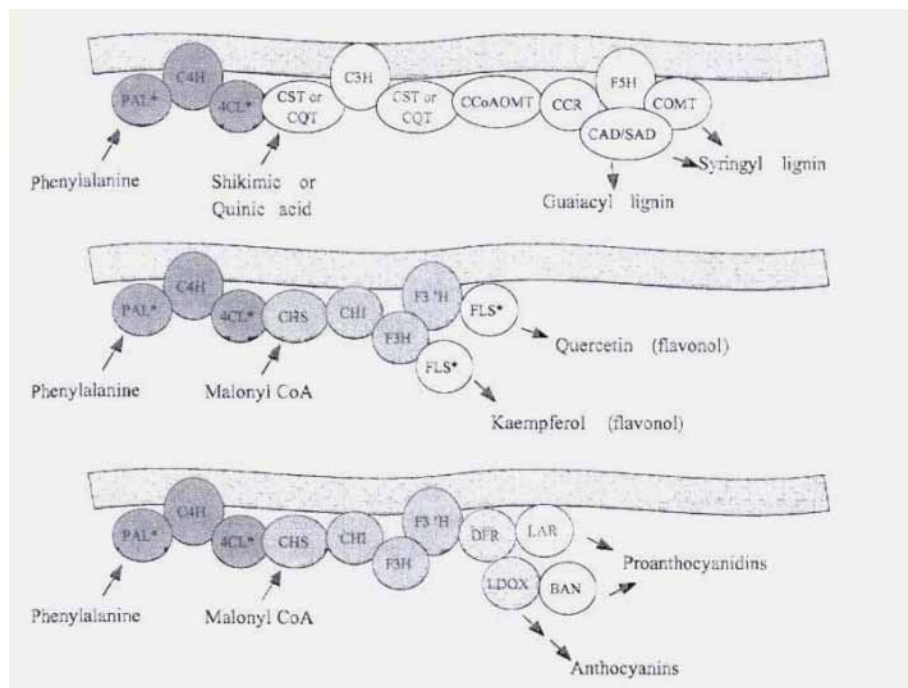


Figure 13. Schéma des différentes branches du métabolisme des phénylpropanoïdes, organisées en voies métaboliques linéaires (métabolons) individuelles (d'après Winkel, 2004).

Enfin, une expression coordonnée d'autres gènes de la voie a été décrite chez de nombreuses espèces, faisant penser à un phénomène de canalisation (channeling) des métabolites vers la production de classes particulières de

phénylpropanoïdes (Winkel, 2004). Ainsi, une canalisation a été mise en évidence chez la luzerne pour la branche des isoflavonoïdes.

En utilisant ce modèle, il est proposé de chercher à mettre en évidence une voie métabolique individuelle (métabolon) pour les ACG chez les caféiers.

Pour cela, il faudra étudier la régulation des gènes intervenant plus particulièrement dans la biosynthèse des ACG en relation avec la régulation des gènes communs à la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.

Cette étude de régulation des gènes ne s'intéressera qu'à la partie promotrice des gènes, même si cette zone n'est pas le seul élément régulateur du gène. Il s'agira d'isoler ces parties promotrices afin d'en connaître la séquence. Ces promoteurs peuvent être obtenus par criblage de banques génomiques ou par isolement de clones dans des banques en BAC (Bacterial Artificial Chromosome). Ce type de banque, réalisé à partir de *C. canephora*, est disponible au CIRAD (T. Leroy). Pour identifier les séquences régulatrices importantes, plusieurs approches complémentaires peuvent être envisagées :

- une approche *in silico* de comparaison de séquences avec des séquences connues régulatrices ;
- une approche fonctionnelle consistant à placer la zone promotrice (complète ou fractionnée) dans une construction génique contenant un gène rapporteur type *Gus* ou *GFP*. Les constructions contenant les zones promotrices complètes seront dans un premier temps intégrées dans le génome d'une plante modèle telle qu'*Arabidopsis*. L'analyse du niveau de l'activité *GUS* dans les différentes parties et tissus de la plante au cours de son développement donnera une image de la régulation spatio-temporelle de l'expression du gène dont on a isolé le promoteur. Il s'agira ensuite de vérifier, par intégration de la construction dans le génome d'un caféier tel que *C. canephora*, que ce promoteur remplit exactement les mêmes fonctions régulatrices. Des constructions pourront être établies à partir de zones promotrices fractionnées. Elles pourront être exprimées de façon transitoire, par biolistique, dans des suspensions cellulaires initiées au Laboratoire. Bien que ce matériel végétal ne présente pas toujours une image exacte de l'expression des gènes *in vivo*, il permettra, en fonction de l'activité *GUS*+ ou *GUS*- observée, d'identifier les éléments régulateurs positifs ou négatifs de l'expression de ces gènes.

Cependant, il peut ne pas y avoir de lien entre la teneur en un composé et l'expression des gènes intervenant dans sa biosynthèse. En effet, la quantité de produit accumulé est la résultante de trois mécanismes physiologiques : biosynthèse, dégradation et transport, ce dernier étant particulièrement développé dans des organes tels que les fruits. Aussi, l'étude seule des voies de biosynthèse ne suffit pas pour comprendre les teneurs observées dans les fruits. Elle doit être associée à une étude des mécanismes d'accumulation et transport des ACG.

2. Etude des mécanismes de transport et d'accumulation des ACG dans le fruit

Plusieurs phénomènes physiologiques peuvent être à l'origine de cette forte teneur en ACG dans les grains de *C. canephora*. En tout premier lieu, elle peut être liée à une production élevée en ACG, attribuable à leur fort anabolisme (forte activité des enzymes de la voie de biosynthèse et forte expression des gènes de fonction associés) ou leur faible catabolisme dans le grain. Mais elle peut également être due à des accumulations préférentielles dans certaines parties du fruit mettant en jeu des mécanismes spécifiques de transport et de compartimentation cellulaires.

Les mécanismes de dégradation des ACG ne feront pas directement l'objet de ce travail, en ce sens que nous ne nous intéresserons pas aux polyphénol-oxydases, enzymes spécialisées dans ce rôle chez d'autres végétaux (Murata et al, 1992 ; Nozué et al, 1998). Par contre, en tenant compte du fait que les ACG sont des intermédiaires dans la voie de synthèse de la lignine, nous pourrions avoir une idée de leur dégradation en suivant l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des lignines et situés en aval de la synthèse des ACG.

Les mécanismes de transport des ACG n'ont pas fait l'objet d'études particulières. Il semblerait que la synthèse de l'acide caféoylquinique soit chloroplastique (Alibert et al, 1977). Son accumulation dans la vacuole, telle qu'elle est décrite dans le fruit, mettrait alors en jeu des mécanismes de transport intracellulaires dont la nature reste à déterminer.

A l'échelle d'un organe tel que le fruit, les zones de synthèse et d'accumulation des ACG n'ont pas encore été définies. Existe-t-il des tissus spécialisés dans ces mécanismes ? La synthèse des ACG existe-t-elle dans le fruit ou bien les ACG sont-ils synthétisés dans d'autres organes et véhiculés vers le fruit en formation par les tissus conducteurs ? Pour répondre à ces questions, il sera tout d'abord nécessaire, par des observations cytologiques, de localiser les ACG dans les différents tissus et compartiments cellulaires afin de connaître les zones préférentielles d'accumulation, sachant que des colorations spécifiques des acides caféoyl et féruloyl quiniques existent. Par hybridation *in situ*, il sera également possible de localiser ensuite les zones dans lesquelles les différents gènes impliqués dans la synthèse sont le plus exprimés. Dans le cas où nous disposerions d'anticorps dressés contre les différentes enzymes, il serait également envisageable de réaliser des immuno-empreintes pour préciser les zones tissulaires présentant une activité enzymatique.

L'ensemble de ces recherches sur la biosynthèse, l'accumulation et le transport des ACG doit permettre de faire le point sur les facteurs intervenant dans les teneurs en ACG dans le fruit. Les résultats conduiront à valider ou non l'utilisation de la transformation génétique pour diminuer, chez *C. canephora*, les teneurs en ACG dans un but d'amélioration de la qualité de son café-boisson.

Ce programme de génomique fonctionnelle tourné vers l'amélioration des plantes peut largement dépasser le cadre des caféiers et du métabolisme des acides chlorogéniques. En effet, il peut être adapté à d'autres plantes accumulant les ACG ou même servir de trame pour l'étude de tout autre métabolisme secondaire chez les caféiers ou d'autres plantes.

IV. BIBLIOGRAPHIE

- Alibert G, Ranjeva R, Boudet AM, 1977. Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. *Physiol. Vég.*, 15(2) : 279-301
- Ambid C, Roustan JP, Nef C, Fallot J, 1982. Influence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the production of ajmalicine and serpentine by cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Dans : Proc. 5th Intl Plant Tissue & Cell Culture, 331-332
- Andrews M, 1986. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. *Plant Cell Environ.*, 9 : 511-519
- Anthony F, Noirot M, Clifford MN, 1993. Biochemical diversity in the genus *Coffea* L.: chlorogenic acids, caffeine and mozambioside contents. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 40 : 61-70
- Assefa F, Kleiner D, 1998. Nodulation pattern and acetylene reduction (nitrogen fixation) activity of some highland and lowland *Acacia* species of Ethiopia. *Biology and Fertility of Soils*, 27 (1) : 60-64
- Balagué C, Wilson G, 1982. Growth and alkaloid biosynthesis by cell suspensions of *Catharanthus roseus* in a chemostat under sucrose and phosphate limiting conditions. *Physiol. Vég.*, 20 : 515- 522
- Bates NJ, Orr J, Ni Meromi A, Nadler-Assar T, Doerner PW, Dixon RA, Lamb C, Elkind J, 1994. Quantitative relationship between phenylalanine ammonia lyase levels and phenylpropanoids accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91 : 7608-7612
- Berthouly M, Michaux-Ferrière NM, 1996. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 44 : 169-176
- Bouquet A, Piganeau B, Lamaison AM 1982. Influence du génotype sur la production de cals, d'embryoïdes et de plantes entières par culture d'anthères *in vitro* dans le genre *Vitis*. *C.R. Acad. Sc., Sér. III, Sciences de la Vie*, 295 : 569-574
- Carneiro MF, 1997. Coffee biotechnology and its application in genetic transformation. *Euphytica*, 96 (1) : 167-172
- Castle de Menezes H, Clifford MN, 1987. The influence of stage of maturity and processing method on the relation between the different isomers of caffeoylquinic acid in green coffee beans. Dans : Proc. 12^{ème} Colloque Scientifique International sur le Café, Montreux (France), 377-381
- Chabrillange N, Dussert S, Engelmann F, Doubeau S, Hamon S, 2000. Desiccation tolerance in relation to soluble sugar contents in seeds of ten coffee (*Coffea* L.) species. *Seed Science Research*, 10 : 393-396
- Courtois D, Guern J, 1980. Temperature response of *Catharanthus roseus* cells cultivated in liquid medium. *Plant Sci. Lett.*, 17 : 473-482
- Courtois D, Kurkdjian A, Guern J, 1980. Tryptamine uptake and accumulation by *Catharanthus roseus* cells cultivated in liquid medium. *Plant Sci. Lett.*, 18 : 85-96
- Courtois D, Pétiard V, 1981. Mise en évidence et origine des alcaloïdes présents dans les milieux de culture de cellules végétales. Dans : 3^{ème} Colloque de la section française de l'I.A.P.T.C. : Production de substances naturelles par des cellules végétales cultivées *in vitro*

- Cramer CL, Edwards K, Dron M, Liang X, Dildine SL, Bolwell GP, Dixon RA, Lamb CJ, Schuch W, 1989. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Mol. Biol.*, 12 : 367-383
- Daddona PE, Wright JL, Hutchinson CR, 1976. Alkaloid catabolism and mobilization in *Catharanthus roseus*. *Phytochem.*, 15 : 941-945
- Deus-Neumann B, Zenk MH, 1986. Accumulation of alkaloids in plant vacuoles does not involve a ion trap mechanism. *Planta*, 167 : 44-53
- Dommergues Y, 1995. Nitrogen fixation by trees in relation to soil nitrogen economy. *Fertilizer Research*, 42 : 215-230
- Dreyfus BL, Dommergues YR, 1981. Nitrogen fixing nodules induced by rhizobium on the stems of the tropical legume *Sesbania rostrata*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 10 : 313-317
- Eilert U, Deluca V, Constabel F, Kurz WGW, 1986. Elicitation of indole alkaloid biosynthesis in periwinkle. Dans : Recognition in Microbe, Plant symbiotic or pathogenic interactions. Lugtenberg B Ed, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 363-366
- Endo T, Goodbody A, Misawa M, 1987. Alkaloid production in root and shoot cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta Med.*, 27 : 2147-2149
- Grace SC, Logan BA, 2000. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos. Trans R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 355 : 1499-1510
- Gueye M, Ndoye I, Dianda M, Danso SKA, Dreyfus B, 1997. Active nitrogen fixation in several *Faidherbia albida* provenances. *Arid Soil Res. Rehabil.*, 11 : 63-70
- Hahlbrock K, Scheel D, 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40 : 347-369
- Hansen AP, Pate JS, 1987. Evaluation of the ¹⁵N natural abundance method and xylem sap analysis for assessing N₂ fixation of understory legumes in Jarrah (*Eucalyptus marginata* Dann ex Sm) forest in SW Australia. *J. Exp. Bot.*, 38 : 1446-1458
- Hardy RWF, Burns RC, Holsten RD, 1973. Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of N₂-fixation. *Soil Biol. Biochem.*, 5 : 47-81
- Health R, Huxley H, Stone B, Spangenberg G, 1998. CDNA cloning and differential expression of three caffeic acid O-methyltransferase homologues from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *J. Plant Physiol.*, 153 : 649-657
- Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, Pollet B, Legrand M, 2004. Silencing of hydroxycinnamoyl-Coenzyme A shikimate/Quinate Hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, 16 : 1446-1465
- Joly HI, Zeh-Nlo M, Danthu P, Aygalent C, 1992. Population genetics of an African acacia, *Acacia albida*. I. Genetic diversity and populations from West Africa: *Austr. J. Bot.*, 40 : 59-73
- Knobloch KH, Berlin J, 1980. Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* L.G. Don. *Z. Naturforsch.*, 35 : 551-556
- King PJ, Ma G, Miao W, Jia Q, McDougall BR, Reinecke MG, Cornell C, Kuan J, Kim TR, Robinson WE Jr., 1999. Structure-activity relationships : analogues of the dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids as potent inhibitors of human

- immunodeficiency virus type 1 integrase and replication. *J. Med. Chem.*, 42(3) : 497-509
- Ky CL, Louarn J, Guyot B, Charrier A, Hamon S, Noirot M, 1999. Relations between and inheritance of chlorogenic acid contents in an interspecific cross between *Coffea pseudozanguebariae* and *Coffea liberica* var. *dewevrei*. *Theor. Appl. Genet.*, 98 : 628-637
- Ky C, 2000. Déterminisme génétique de quelques composés biochimiques de la graine de café vert impliqués dans la qualité à la tasse. Etude d'un croisement interspécifique entre *Coffea pseudozanguebariae* et *C. liberica* var. *Dewevrei*. Thèse ENSAM, 157 p.
- Ky CL, Louarn J, Dussert S, Guyot B, Hamon S, Noirot M, 2001. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chem.*, 75 : 223-230
- Lee SL, Cheng KD, Scott AL, 1981. Effects of bioregulators on indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell culture. *Phytochem.*, 20(8) : 1841-1843
- Leloup V, Louvrier A, Liardon R, 1995. Degradation mechanisms of chlorogenic acids during roasting. Dans : Proceedings of the 16th International Congress of ASIC, 192-198
- Leroy T, Royer M, Paillard M, Berthouly M, Spiral J, Tessereau S, Legrave T, Altosaar I, 1997. Introduction de gènes d'intérêt agronomique dans l'espèce *Coffea canephora* Pierre par transformation par *Agrobacterium* sp. Dans : ASIC 17^e Colloque, Nairobi, 439-446
- Levy A, Milo J, Ashri A, Palevitch D, 1984. Heterosis and correlation analysis of the vegetative components and ajmalicine content in the roots of the medicinal plant *Catharanthus roseus* L.G. Don. *Euphytica*, 32 : 557-564
- Lois R, Dietrich A, Halbrock K, Schulz, W, 1989. A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *EMBO J.*, 8 : 1641-1648
- Maher EA, Bate NJ, Ni W, Elkin Y, Dixon RA, Lamb CJ, 1994. Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of performed phenylpropanoid products, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91 : 7802-7806
- Martz F, Maury S, Pinçon G, Legrand M, 1998. cDNA cloning, substrate specificity and expression study of tobacco caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, a lignin biosynthetic enzyme. *Plant Mol. Biol.*, 36 : 427-437
- Matsuda F, Morino K, Miyashita M, Miyagawa H, 2003. Metabolic flux analysis of the phenylpropanoid pathway in wound-healing potato tuber tissue using stable isotope-labeled tracer and LC-MS spectroscopy. *Plant Cell Physiol.*, 44 : 510-517
- Matt P, Krapp A, Haake V, Mock H-P, Stitt M, 2002. Decreased Rubisco activity leads to dramatic changes of nitrate metabolism, amino acid metabolism and the levels of phenylpropanoids and nicotine in tobacco antisense *RBCS* transformants. *Plant J.*, 30(6) : 663-667
- Mazzafera P, 1991. Trigonelline in coffee. *Phytochem.*, 30 : 2309-2301
- Mc Keehen JD, Busch RH, Fulcher RG, 1999. Evaluation of wheat (*Triticum aestivum* L.) phenolic acids during grain development and their contribution to *Fusarium* resistance, *J. Agr. Food. Chem.*, 47 : 1476-1482

- Mc Nally SF, Hirel B, Gadal P, Mann AF, Stewart GR, 1983. Glutamine synthetase of higher plants. Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. *Plant Physiol.*, 72 : 22-25
- Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15 : 473-497
- Murata M, Kurokami C, Homma S, 1992. Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple. *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, 56 : 1705-1710
- Ndoye I, Gueye M, Danso SKA, Dreyfus B, 1995. Nitrogen fixation in *Faidherbia albida*, *Acacia raddiana*, *Acacia senegal* and *Acacia seyal* estimated using the ¹⁵N isotope dilution technique. *Plant Soil*, 172 : 175-180
- Nef-Campa C, 1992. Bilan du programme *Catharanthus*, 1987-1991. Rapport interne Orstom, diffusion MAA, UR3B, CS4, 53 pp
- Niggeweg R., Michael AJ, Martin C, 2004. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology*. 22(6) : 746-754
- Nozué M, Soury M, Arakawa D, Kojima M, 1998. Purification and characterization of two isoforms of chlorogenic acid oxidase from sweet potato cells in suspension culture. *J. Plant Physiol.*, 153 : 552-557
- Ohiokpehai O, Brumen G, Clifford MN, 1982. The chlorogenic acids content of some peculiar green coffee beans and the implications for beverage quality. Dans : ASIC 10^e Colloque, Salvador, 177-185
- Payen A, 1846. Premier mémoire sur le café. *C. R. A. S.*, Paris, 22 : 724-737
- Pearson J, Ji YM, 1994. Seasonal variation of leaf glutamine synthetase isoforms in temperate deciduous trees strongly suggests different functions for the enzymes. *Plant Cell. Environ.*, 17 : 1331-1337
- Pétiard V, Courtois D, Guérite F, Langlois N, Mompon B, 1982. New alkaloids in plant tissue culture. Dans : Plant tissue culture. Fujiwara A. Edr. Japanese Association for Plant Tissue Culture, Maruzen. Tokyo, 309-310
- Rajasekaran K, Mullins MG, 1979. Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. *J. Exp. Bot.*, 30(116) : 399-407
- Reda F, 1978. Distribution and accumulation of alkaloids in *Catharanthus roseus* G. Don during development. *Pharmazie*, 33 : 233-234
- Renaudin JP, 1982. Etude des mécanismes de compartimentation des alcaloïdes indoliques dans des suspensions de cellules de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynacées). Thèse de Docteur Ingénieur. INAPG, 173 pp
- Renaudin JP, Guern J, 1982. Compartmentation mechanisms of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Physiol. Vég.*, 20 : 533-547
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G, 1997. Antioxydant properties of phenolic compounds trends. *Plant Sci.*, 2 : 152-159
- Rose T, Schultz E, Henikoff J, Pietrokovski S, McCallum C, Henikoff S, 1998. Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primers for Amplification of Distantly Related Sequences. *Nucleic Acids Research*, 26(7) : 1628-1635
- Roustan JP, 1981. Régulation par les auxines de l'accumulation de certains alcaloïdes indoliques dans les cellules quiescentes de *Catharanthus roseus* cultivées *in vitro*. *Physiol. Vég.*, 20(3) : 523-532

- Samson NP, Campa C, Noirot M, de Kochko A, 2004. Potential use of D-xylose as a selective agent in coffee plant transformation. Dans : ASIC 20^e Colloque, Bangalore, India (site internet)
- Sanginga N, Bowen GD, Danso SKA, 1990. Assessment of genetic variability for N₂-fixation between and within origins of *Leucaena leucocephala* and *Acacia albida* estimated by 15N labelling techniques. *Plant Soil*, 127 : 169-178
- Schoch G, Goepfert S, Morant M, Hehn A, Meyer D, Ullmann P, Werck-Reichhart D, 2001. CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.*, 276 : 36566-36574
- Sinclair TR, Serraj R, 1995. Legume nitrogen fixation and drought. *Nature*, 379 : 344
- Sondheimer E, Covitz F, Marquisee MJ, 1961. Association of naturally occurring compounds: the chrologenic acid-caffeine complex. *Arch. Biochem. Biophys.*, 93 : 63-71
- Sprent JI, 1980. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae. *Plant Cell Environ.*, 3 : 35-43
- Srinivasan C, Mullins MG, 1980. High-frequency somatic embryo production from unfertilized ovules of grapes. *Sci. Hort.*, 13(3) : 245-252
- Stockigt J, Treimer J, Zenk MH, 1976. Synthesis of ajmalicine and related indole alkaloids by cell free extracts of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *FEBS Lett.*, 70 (1) : 267-270
- Van Kessel C, Roskoski JP, Keane K, 1988. Ureide production by N₂-fixing and non-N₂-fixing leguminous trees. *Soil Biol Biochem.*, 20 : 891-897
- Waddel WJ, Buttler TC, 1959. Calculation of intracellular pH from the distribution of 5,5-dimethyl-2,4-oxazoloni-neione (DMO). Application to skeletal muscle of the dog. *J. Clin. Invest.*, 38 : 720-729
- Wagner F, Vogelmann H, 1977. Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. Dans: Plant tissue culture and its biotechnological application. Barz W, Reinhard E et Zenk MH Ed, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Winkel BSJ, 2004. Metabolic channeling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55 : 85-107
- Woodall J, Forde BG, 1996. Glutamine synthetase polypeptides in the roots of 55 legume species in relation to their climatic origin and the partitioning of nitrate assimilation. *Plant Cell. Environ.*, 19 : 848-858
- Yoneyama T, Kondo M, 1990. *Sesbania* spp., *Aeschynomene indica* and *Crotalaria* spp. are amide exporters. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 36 : 689-693
- Zenk MH, El-Shagi H, Arens H, Stockigt J, Weiler EW, Deus B, 1977. Formation of indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Dans: Plant Tissue Culture and its bio-technological application. Barz W, Reinhard E et Zenk MH Ed, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York