



HAL
open science

Étude métabolomique de lin (*Linum usitatissimum*) mutant pour la voie de biosynthèse des lignanes

Marie-Aude Tribalat

► **To cite this version:**

Marie-Aude Tribalat. Étude métabolomique de lin (*Linum usitatissimum*) mutant pour la voie de biosynthèse des lignanes. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01400618

HAL Id: dumas-01400618

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01400618v1>

Submitted on 22 Nov 2016

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

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

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE - UFR Pharmacie

THESE

pour obtenir le titre de
Docteur en Pharmacie
de l'UNIVERSITE de Picardie Jules Verne

présentée et soutenue par
Marie-Aude TRIBALAT

**Etude métabolomique de lin (*Linum usitatissimum*) mutant
pour la voie de biosynthèse des lignanes**

Thèse dirigée par Ophélie Fliniaux
soutenue le 9 septembre 2016

Jury :

François Mesnard

Ophélie Fliniaux

Hélène Cailliez

Président

Directeur de thèse

Docteur en Pharmacie

Remerciements

A François Mesnard pour m'avoir permis de réaliser ce stage de recherche, pour son encadrement, sa gentillesse et la confiance qu'il m'a accordée.

A Ophélie Fliniaux pour son aide, ses explications et ses conseils lors de la réalisation des manipulations et de la rédaction de cette thèse.

A Hélène Cailliez, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour son amitié inconditionnelle depuis cette première année de pharmacie.

A Eric Gontier, directeur du laboratoire BIOPI, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour la réalisation de cette étude.

A Roland Molinié et Jean-Xavier Fontaine pour leur aide lors de la réalisation des analyses RMN et du traitement des données ainsi que pour toutes leurs explications.

A Sullivan Renouard pour son aide lors de la rédaction de cette thèse et pour ses explications et conseils.

A Margaux Laignel pour son sérieux et son assiduité lors de la réalisation des manipulations durant son stage de deuxième année de DUT.

A Emmanuel Petit, Redouan El Boutachfaiti et Anthony Quéro pour leur aide, leurs explications et leurs conseils lors de la réalisation des extractions et des analyses du mucilage.

A tous les membres de l'équipe BIOPI avec qui j'ai pu travailler de près ou de loin pour leur bonne humeur et leur gentillesse.

A Dominique Cailleu de la plateforme analytique pour la formation qu'il m'a apportée lors de l'utilisation des spectromètres RMN.

A l'équipe Lignanes de Linacées de l'Antenne Scientifique Universitaire de Chartres, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (EA 1207) de l'université d'Orléans et notamment Christophe Hano et Frédéric Lamblin pour leurs explications et leur disponibilité.

A mes parents et mes sœurs Julie et Sixtine pour leur soutien et leur confiance tout au long de mes études.

A mes amis pharmaciens, Carole, Matthieu, Clémence pour ces années passées ensemble.

Table des matières

Abréviations.....	4
Introduction.....	5
A. Etat de l'art.....	7
1. Métabolomique.....	7
2. La Spectrométrie par Résonance Magnétique Nucléaire.....	9
3. Le lin et les composants de sa graine	10
a. Les acides gras.....	12
b. Le mucilage	13
c. Les phénylpropanoïdes.....	14
B. Matériel et méthodes	19
1. Matériel végétal	19
a. Graines issues de différentes lignées de lins	19
b. Graines de lin de différentes variétés cultivées	19
2. Analyse des acides gras par RMN HR MAS.....	20
3. Extraction et analyse du mucilage	21
4. Broyage et extraction hydro-alcoolique des métabolites des graines.....	22
5. Analyse métabolomique par RMN de la fraction hydro-alcoolique.....	22
6. Quantification par CLHP des lignanes et de leurs précurseurs	24
C. Résultats.....	25
1. Analyse du contenu en acides gras de graines de lins issues de plantes transgéniques.....	25
a. Détermination des proportions d'acides gras dans les graines ARNi PLR.....	26
b. Détermination des proportions d'acides gras dans les graines F-5-H +	27
2. Analyse de la composition du mucilage des graines issues des lignées F-5-H + et des 33 variétés de lins cultivées	28
a. Etude préliminaire de la corrélation existant entre la composition du mucilage et la teneur en oméga 3 de graines de différentes variétés de lin cultivées	28
3. Etude préliminaire de la composition du mucilage chez les lignées de lins transgéniques F-5-H +	29

4. Etude métabolomique de la fraction hydro-alcoolique extraite des graines de lins transgéniques.....	30
a. Etude métabolomique par RMN ¹ H	30
b. Quantification des lignanes et de leurs précurseurs.....	34
D. Discussion.....	38
1. 33 variétés non discriminées par la composition de leur mucilage	38
2. Réorganisations métaboliques dans les plantes transgéniques pour la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes.....	39
a. Influence de l'inhibition de l'expression du gène codant pour la PLR sur le métabolome .	40
b. Influence de la surexpression du gène codant pour la F-5-H sur le métabolome.....	42
E. Conclusion et perspectives	44

Annexe

Abréviations

4CL	4-Coumarate CoA-Ligase
ACP	Analyse à Composante Principale
ARNi	ARN Interférence
C3H	p-Coumarate 3-Hydroxylase
C4H	Cinnamate 4-Hydroxylase
CAD	Cinnamyl Alcohol Déshydrogénase
CAG	Acide Coumarique Glycosylé
CAFG	Acide CaFéique Glycosylé
CCoAOMT	Caffeoyl-CoA O-MéthylTransférase
CCR	Cinnamoyl-CoA Réductase
COMT	Acide Caféique O-MéthylTransférase
D₂O	Eau deutérée
DCG	Alcool DéhydrodiConiférylique
DDCG	Alcool DihydroDéhydrodiConiférylique
DCI	Acide chlorhydrique deutéré
F-5-H	Férulate-5-Hydroxylase
F-5-H +	Lin surexprimant le gène F-5-H
F1, F3, F4, F5, F6 :	Lignées de lin surexprimant le gène F-5-H
FAG	Acide Férulique Glycosylé
FT	Faible Teneur en ω -3
FI	Teneur Intermédiaire en ω -3
GC-MS	Chromatographie Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse
HDG	Herbacétine DiGlucoside
HMG	HydroxyMéthylGlutarate
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
HT	Haute Teneur en ω -3
LC-MS	Chromatographie Liquide couplée à un Spectromètre de Masse
LuT	Lignée de lin Témoin
MS	Spectrométrie de Masse
NaOD	Soude deutérée
PAL	Phénylalanine Ammonia-Lyase
PDG	Pinorésinol DiGlucoside
Pi1 « X »	Lignées de lins transgéniques inhibant l'expression de la <i>PLR</i>
PLR	Pinorésinol-Laricirésinol-Réductase
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN HR MAS	RMN haute résolution à l'Angle Magique
SDG	Sécoisolaricirésinol DiGlucoside
TFA	Acide TriFluoroacétique

Introduction

Un des thèmes abordés par l'axe 2 de l'unité BIOPI est la compréhension des mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes ainsi que les relations existantes entre ces métabolites et les autres composants de la graine de lin (*Linum usitatissimum*). Bien que leur rôle *in planta* soit très peu décrit, les phénylpropanoïdes dont fait partie le groupe des lignanes sont des composés présentant un intérêt particulier pour leurs propriétés biologiques dans le cadre de la nutrition et de la santé humaine^{1,2}. La compréhension de leur métabolisme est donc un enjeu important d'un point de vue fondamental mais également appliqué.

La voie de biosynthèse de ces phénylpropanoïdes ainsi que celle des lignanes sont actuellement bien décrites dans la littérature^{3,4}. Ces connaissances permettent d'établir les relations entre les différents métabolites de ces voies de biosynthèse mais également de cibler les enzymes d'intérêt grâce aux techniques de biologie moléculaire et d'étudier leur impact sur l'ensemble de la plante en modifiant l'expression des gènes par lesquels elles sont codées. Afin d'approfondir les connaissances établies sur ce sujet, une étude métabolomique ainsi que des études plus ciblées ont été mises en place sur différents types de graines de lin.

Une partie des travaux de thèse d'Aïna Ramsay a montré une relation négative entre la teneur en ω -3 contenus dans l'huile de la graine de lin et la teneur en lignanes présents dans le tégument de ces graines⁵. Dans le but de compléter cette étude, les 33 variétés cultivées de lin étudiées précédemment ont fait l'objet d'une analyse de la composition de leur mucilage afin d'établir une éventuelle corrélation entre ce composant et ceux étudiés antérieurement.

L'expérimentation a également porté de façon plus importante sur l'étude de graines issues de différents lins transgéniques pour la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes : d'une part, des plantes surexprimant le gène codant la férulate-5-hydroxylase (F-5-H), enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, et d'autre part des plantes inhibant le gène codant pour la pinorésinol-laricirésinol-réductase (PLR), enzyme impliquée dans la voie de

¹ F. Lamblin, C. Hano, O. Fliniaux, F. Mesnard, M-A. Fliniaux, et E. Lainé. «Intérêt des lignanes dans la prévention et le traitement de cancers.» *Medecine Sciences* **24** (2008): 511-519.

² L.G. Korkina «Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health.» *Cellular and Molecular Biology* **53** (2007): 15-25.

³ B.Weisshaar et G.I. Jenkins. «Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation.» *Current Opinion in Plant Biology* **1** (1998): 251-257.

⁴ N.G., Lewis et L.B. Davin. «Lignans: biosynthesis and function.» *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 1999: 639-712.

⁵ A. Ramsay, O. Fliniaux, J. Fang, R. Molinié, A. Roscher, E. Grand, X. Guillot, J. Kovensky, M.-A. Fliniaux, B. Schneider et F. Mesnard, «Development of an NMR metabolomics-based tool for selection of flaxseed varieties.» *Metabolomics*, 2014. 10(6): 1258-1267.

biosynthèse des lignanes. Une étude métabolomique par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H) a d'abord été réalisée, puis une analyse par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) ciblée sur les différents phénylpropanoïdes présents dans ces graines a été mise en place. La composition en acides gras de ces graines de lin a également été étudiée par résonance magnétique nucléaire haute résolution à l'angle magique (RMN HR MAS) ainsi que la composition du mucilage par chromatographie haute performance échangeuse d'anions (HPAEC).

A. Etat de l'art

1. Métabolomique

La perception de l'organisation du monde végétal a connu une avancée marquée ces dernières années grâce à l'apparition des approches « omics » telles que la génomique, la transcriptomique, la protéomique auxquelles sont venues s'ajouter plus récemment la métabolomique et la fluxomique^{6,7} (Figure 1). Ces différentes approches consistent en l'étude de l'ensemble des acteurs impliqués à différents niveaux cellulaires et subcellulaires et aboutissant à l'aménagement du phénotype d'un organisme⁸.

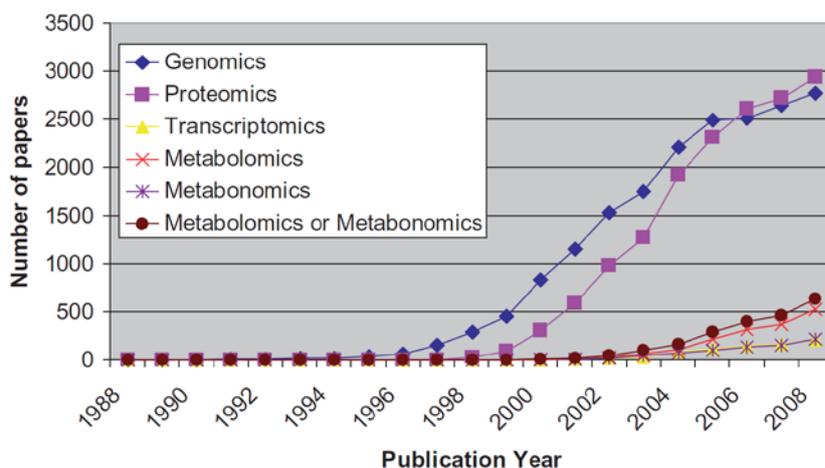


Figure 1 : Nombre de publications trouvées pour les termes respectifs dans la littérature, ISI Web of Science (Thomson Scientific)⁸.

La métabolomique ambitionne l'étude de l'ensemble des métabolites présents dans un organe ou un organisme entier. Associée à la génomique et à la transcriptomique, la métabolomique représente un outil important utilisé dans les études de génomique fonctionnelle permettant d'identifier et d'expliquer la fonction des différents gènes et de définir les voies métaboliques ainsi que leurs modifications selon les conditions extérieures ou en cas de stress biotiques ou abiotiques⁹. Ce type d'approche permet d'avoir une vision de la plante sous forme d'un système intégré comprenant différentes voies métaboliques liées entre elles par différents

⁶ L.W. Sumner, P. Mendes et R.A. Dixon. «Plant metabolomics : large-scale phytochemistry in the functional genomics era.» *Phytochemistry* **62** (2003): 817-836.

⁷ J. Schripsema «Application of NMR in Plant Metabolomics: Techniques, Problems and Prospects.» *Phytochemical Analysis* **21** (2009): 14-21.

⁸ A. Fukushima, M. Kusano, H. Redestig, M. Arita et K. Saito. «Integrated omics approaches in plant systems biology.» *Current Opinion in Chemical Biology* **13** (2009): 532-538.

⁹ K. Saito et F. Matsuda. «Metabolomics for Functional Genomics, Systems Biology, and Biotechnology.» *Annual Review of Plant Biology* **61** (2010): 463-489.

précurseurs et différents types de régulations en amont ou en aval aboutissant à des phénotypes complexes et variés⁶.

Les différences métaboliques sont abordées de différentes manières selon le but recherché pour l'étude entreprise :

- Le profilage métabolique consiste à cibler une famille de composés présentant le même type de structures chimiques.
- La métabolomique envisage l'analyse du métabolome dans sa totalité sans restriction à un groupe de molécules en particulier et dans la mesure où les techniques d'analyses le permettent.
- L'empreinte métabolique ou « fingerprinting » permet d'établir une comparaison entre deux organismes par détermination de métabolites discriminants. Cette approche permet de repérer la ou les familles métaboliques susceptibles de subir des modifications d'un organisme à l'autre et d'approfondir l'étude par profilage métabolique.

La complexité principale des études métabolomiques réside dans la diversité structurale rencontrée au niveau des métabolites existant au niveau d'une plante. Le nombre de métabolites dans le monde végétal est estimé entre 200 000 et 1 000 000⁹ et à environ 5 000 pour une seule plante^{7,10}. Les métabolites sont classés en deux groupes¹¹ :

- Les métabolites primaires, composés indispensables à la plante, sont impliqués dans les mécanismes de croissance, de photosynthèse et de reproduction.
- Les métabolites secondaires sont des composés impliqués dans des mécanismes de défenses contre des pathogènes, d'adaptation à différents types de stress et de communication entre la plante et son environnement. Les métabolites secondaires ne sont pas ubiquitaires et sont généralement spécifiques d'une espèce ou d'une famille végétale donnée.

Ces différents composés expriment non seulement des propriétés chimiques très différentes mais ils présentent également des activités biologiques et des localisations cellulaires et subcellulaires variées, ce qui accentue la difficulté de leur analyse en une seule et même manipulation. En outre, les variations de concentrations ($\sim 10^6$ M) existant entre les différents types de métabolites compliquent davantage l'analyse du métabolome.

¹⁰ P. Krishnan, N.J. Kruger et R.G. Ratcliffe. «Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR.» *Journal of Experimental Botany* **56** (2005): 255-265.

¹¹ R. Verpoorte, Y.H. Choi, N.R. Mustafa et H.K. Kim. «Metabolomics: back to basics.» *Phytochemistry reviews* **7** (2008): 525-537.

En raison des différents inconvénients rencontrés, les études métabolomiques font intervenir diverses techniques d'analyses dont les plus fréquentes sont la chromatographie liquide à haute performance (CLHP) couplée à un détecteur UV, la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), la spectrométrie de masse (MS) et la spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN)^{9,11}. Ces différents outils présentent chacun leurs avantages et inconvénients mais sont complémentaires et leur association permet de s'approcher de l'exhaustivité lors de l'étude d'un métabolome (Tableau 1).

Tableau 1 : Comparaison des méthodes analytiques utilisées en métabolomique. L'échelle variant de – pour les désavantages majeurs à +++ pour les avantages majeurs¹¹.

	CLHP	GC-MS	LC-MS	MS ⁿ	RMN
Préparation d'échantillon	++	-	-	+	+++
Reproductibilité	-	+	-	+	+++
Quantification absolue	-	-	-	-	+++
Quantification relative	+	++	+	++	+++
Identification	+	++	++	++	++
Sensibilité	+	++	++	+++	-

2. La Spectrométrie par Résonance Magnétique Nucléaire

La RMN, comme le montre le tableau 1, présente de nombreux avantages dans le cadre d'une analyse métabolomique, notamment par empreinte métabolique. Cette technique a été largement utilisée dans le cadre d'étude génomique fonctionnelle soit sur des plantes transgéniques soit sur des plantes exposées à différents types de stress^{12,13}.

Cette technique permet la mesure du champ magnétique de noyaux tels que l'hydrogène ¹H et le carbone ¹³C qui varie en fonction de leur environnement électronique et donc de leur

¹² R. Verpoorte, Y.H. Choi, et H.K. Kim. «NMR-based metabolomics at work in phytochemistry.» *Phytochemistry Review* **6** (2007): 3-14.

¹³ H-K. Choi, C. Young Hae, M. Verberne, A.W.M. Lefeber, C.Erkelens et R.Verpoorte. «Metabolic fingerprinting of wild type and transgenic tobacco plants by 1H NMR and multivariate analysis technique.» *Phytochemistry* **65** (2004): 857-864.

localisation moléculaire¹⁴. Les métabolites étant des composés organiques formés essentiellement de protons et de carbone, la RMN se révèle être une technique quasi universelle dans ce domaine et chaque métabolite présente un spectre qui lui est spécifique. Cette technique appliquée à un extrait végétal aboutit à un spectre qui est en réalité la superposition de ceux de tous les métabolites présents. Ces données obtenues après le traitement des spectres peuvent être étudiées par une analyse multivariée afin de déterminer quels sont les pics du spectre qui sont discriminants et d'identifier alors les métabolites dont les quantités varient d'un échantillon à l'autre. Ce type d'analyse peut être réalisé à partir de spectres ¹H en une dimension mais également à partir de spectres en deux dimensions qui peuvent permettre de détecter des composés présents en quantités trop faibles pour être détectés en une dimension et de séparer des composés dont les spectres se superposent totalement en une dimension¹⁵.

Malgré sa sensibilité relativement faible (10^{-6} M)⁶, la RMN reste une technique de choix en matière de profilage métabolique puisque c'est une technique non destructive, qu'elle est universelle, qu'elle ne nécessite pas une préparation d'échantillon complexe et que celui-ci peut être liquide ou solide¹⁰. L'utilisation de solvants deutérés permet d'éliminer les signaux des protons des solvants et pour les noyaux naturellement peu abondants, les molécules étudiées peuvent être enrichies ce qui permet également d'envisager des études fluxomiques pour suivre le déplacement des noyaux enrichis au cours d'une voie métabolique. Suite à un profilage métabolique, la RMN peut également aboutir à l'identification des composés d'intérêt.

3. Le lin et les composants de sa graine

Le lin appartient à la famille des Linacées. Cette famille végétale compte 301 espèces dont 180 du genre *Linum*, dont des espèces cultivées comme *Linum usitatissimum*. Le lin regroupe différentes variétés cultivées pour leur propriété mécanique et appelées « lin fibre » ou pour leur propriété oléagineuse et appelées « lin graine ».

Le lin est une dicotylédone dont la tige mesure 0,8 à 1,2 m et porte une inflorescence en cyme dont la couleur varie (bleu, rouge, blanc rosé) selon la variété cultivée. Après autopollinisation par cléistogamie, une capsule se forme contenant jusqu'à 10 graines de couleur jaune claire à brune, chacune pesant entre 4 et 7 mg.

¹⁴ W. Eisenreich et A. Bacher. «Advances of high-resolution NMR techniques in the structural and metabolic analysis of plant biochemistry.» *Phytochemistry* **68** (2007): 2799-2815.

¹⁵ C. Ludwig et M.R. Viant. «Two-dimensional J-resolved NMR Spectroscopy : Review of a Key Methodology in teh Metabolomics Toolbox.» *Phytochemical Analysis* **21** (2009): 22-32.

La culture du lin est très ancienne (8 000 ans av. J.C.), elle était largement implantée en Egypte et en Europe où le lin était utilisé pour fabriquer du papier et des tissus. Durant plusieurs siècles, de nombreux ouvriers français ont vécu de la culture du lin jusqu'à la révolution industrielle du XVIII^{ème} siècle. La surface allouée à la culture du lin déclina ensuite progressivement jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle. A partir des années 1960, les progrès en production végétale (matériels agricoles, produits phytosanitaires) et le début des sélections variétales relance l'industrie linière française. Aujourd'hui le lin français est majoritairement cultivé dans le Nord Ouest (du département du Calvados au département du Nord en passant par l'Eure-et-Loire, la Seine-et-Marne et la Marne) (Figure 2).

Le lin fibre est majoritairement cultivé en France, en Belgique et aux Pays-Bas. Avec 6000 producteurs, la France est le premier producteur mondial de ces variétés de lin et exporte ses récoltes vers la Chine, l'Italie, et l'Amérique du Nord. La fibre de lin est utilisée dans la fabrication de vêtements, de matériaux composites, de matériaux isolants et de meubles. Les graines issues de ces plantes sont destinées à la production d'huile.

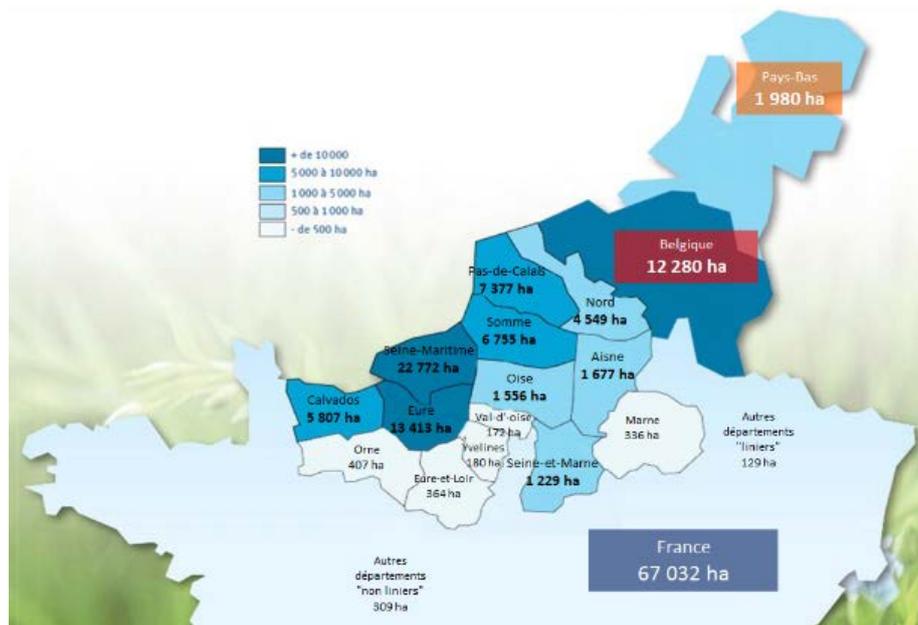


Figure 2 : Répartition géographique de la surface allouée à la culture française de lin en 2014¹⁶

Contrairement au lin fibre, en Europe, la culture du lin graine a été instaurée après la seconde guerre mondiale. Actuellement, l'Inde, le Canada et la Chine sont les principaux producteurs mondiaux de ces variétés à huile. L'intérêt pour la graine de lin (Figure 3) est justifié par sa composition variée : 35 à 45 % d'huile présentant une teneur importante en acide linoléique,

¹⁶ GNIS Section Plantes à Fibres, *Le lin côté nature*, www.lelin-cotenature.fr, 03-05-2016

jusqu'à 10 % de mucilage et de nombreux métabolites secondaires de différente nature chimique tels que les lignanes et les glucosides acides hydroxycinnamiques¹⁷.



Figure 3 : Photo de graines de lin (*Linum usitatissimum*) variété Barbara

a. Les acides gras

L'huile de lin représentant 35 à 45 % de la masse de la graine est composée de différents acides gras dont 3 sont prédominants (Tableau 2).

Tableau 2 : Composition des graines de lin en acides gras¹⁷.

Acides gras	Pourcentage des acides gras totaux
Acides gras de longueur inférieure à 16 carbones	Moins de 1 %
Acide palmitique (C 16 : 0)	3 à 8 %
Acide palmitoléique (C 16 : 1)	Moins de 1 %
Acide stéarique (C 18 : 0)	2 à 8 %
<u>Acide oléique (C 18 : 1)</u>	<u>11 à 35 %</u>
<u>Acide linoléique (C 18 : 2)</u>	<u>11 à 24 %</u>
<u>Acide linoléinique (C 18 : 3)</u>	<u>35 à 65 %</u>
Acide arachidique (C 20 : 0)	Moins de 1 %

Les acides gras constituent les réserves nourricières nécessaires au développement de la plante à la période de la germination.

Cette huile de lin est utilisée dans de nombreux domaines industriels comme la fabrication de peintures, de revêtement protecteur, de linoléum, d'encre, de savons, de mastics et de lubrifiants. Dans le domaine de l'alimentation, cette huile n'a pu être commercialisée que

¹⁷ J. Bruneton. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. 4^{ème} édition. Lavoisier, 2009.

récemment en petits volumes en raison de son fort degré d'insaturation qui ne permet pas sa conservation sur de longues durées.

La composition en acides gras de l'huile de lin se distingue particulièrement des autres huiles végétales commerciales en raison de sa forte teneur en acides gras polyinsaturés tels que l'acide linoléique (ω -6) et l'acide linoléique (ω -3). Cette présence abondante contribue à de nombreuses propriétés bénéfiques en termes de nutrition et de santé humaine car les acides gras polyinsaturés ne sont pas synthétisés *de novo* chez les mammifères et doivent être apportés par l'alimentation¹⁸. Pour une alimentation équilibrée, l'apport de ces deux types d'acides gras doit être équivalent (ratio ω -6/ ω -3 = 5) ce qui n'est pas le cas actuellement dans l'alimentation occidentale. Actuellement ce ratio est estimé entre 15 et 16,7 et les effets bénéfiques potentiels sur la santé de ces deux acides gras disparaissent au profit d'effets délétères comme les maladies cardio-vasculaires, les cancers, les maladies inflammatoires et auto-immunes¹⁹. Une consommation plus importante au quotidien de ces acides gras polyinsaturés avec un ratio de 5 permet la prévention de différentes pathologies telles que les maladies cardiovasculaires et les hypercholestérolémies^{18,20}. La graine de lin étant l'une des sources végétales les plus riches en acide linoléique pourrait donc avoir un rôle important à jouer dans l'alimentation quotidienne afin d'obtenir ce rapport ω -6/ ω -3 et permettre la prévention des maladies les plus délétères dans les populations occidentales.

b. Le mucilage

Le mucilage est présent dans de nombreuses espèces végétales, majoritairement dans les graines et les racines. La graine de lin en contient 3 à 9 %²¹. Le mucilage du lin est composé d'une fraction acide (rhamnogalacturonanes de type I) et d'une fraction neutre (Tableau 3)²².

¹⁸ G. Barcelo-Coblijn et E.J. Murphy. «Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels.» *Progress in Lipid Research* **48** (2009): 355-374.

¹⁹ A.P., Simopoulos «The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids.» *Biomedicine & Pharmacotherapy* **56** (2002): 365-379.

²⁰ D. Rodriguez-Leyva, C. MD Bassett, R. Pierce et G.N. McCullough. «The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid.» *Canadian Journal of Cardiology* **6** (2010): 489-496.

²¹ B.D. Oomah, B. E.O. Kenaschuk, W. Mazza et G. Cui. «Variation in the Composition of Water-Soluble Polysaccharides in Flaxseed.» *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **43** (1995): 1484-1488.

²² J. Warrand, P. Michaud, L. Picton, G. Muller, B. Courtois, R. Ralainirina et J. Courtois «Large-Scale Purification of Water-Soluble Polysaccharides from Flaxseed Mucilage and Isolation of a New Anionic Polymer.» *Chromatographia* **58** (2003): 331-335.

Tableau 3 : Composition du mucilage de la graine de lin (N.D. : non détecté).

	Fraction neutre	Fraction acide
Rhamnose	3,1 %	41,3 %
Xylose	62,0 %	3,5 %
Fucose	6,6 %	7,4 %
Galactose	12,7 %	22,2 %
Arabinose	12,7 %	N.D.
Acide galacturonique	2,3 %	23,3 %

La chaîne principale de la fraction acide est formée par le motif [\rightarrow 2)- α -L-Rha-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalA-(1 \rightarrow] sur lequel sont greffés des résidus fucose et galactose en position *O*-3 du rhamnose. La fraction neutre est composée de chaînes arabinoxylanes très ramifiées en position *O*-2 et *O*-3.

Le mucilage de la graine de lin est utilisé pour ses propriétés biologiques dans le traitement des troubles intestinaux et dans certains produits cosmétiques comme antimicrobien et antibactérien.

c. Les phénylpropanoïdes

Les phénylpropanoïdes constituent le deuxième plus grand groupe de métabolites représentés dans le règne végétal². Ce sont des métabolites secondaires dérivés de la phénylalanine. La voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes est complexe car constituée de nombreuses voies métaboliques se recoupant entre elles. La première des enzymes intervenant dans cette voie est la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) permettant de transformer la phénylalanine en *p*-coumarate. Cette molécule est un précurseur commun à la production de différentes classes de composés tels que les flavonoïdes, les coumarines, les stilbènes, les lignanes et les lignines (Schéma 1). Ces métabolites secondaires se différencient chimiquement et leurs localisations dans la plante sont variables. Ils présentent également des rôles différents comme des propriétés de défense contre les stress biotiques et abiotiques, de signalisation, de pigmentation ou encore de structure³. Cette voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes aboutit notamment à la formation d'alcool coniférylique qui constitue l'unique précurseur de la voie de biosynthèse des lignanes et de celle des flavonoïdes et un des trois précurseurs de la voie de biosynthèse des lignines.

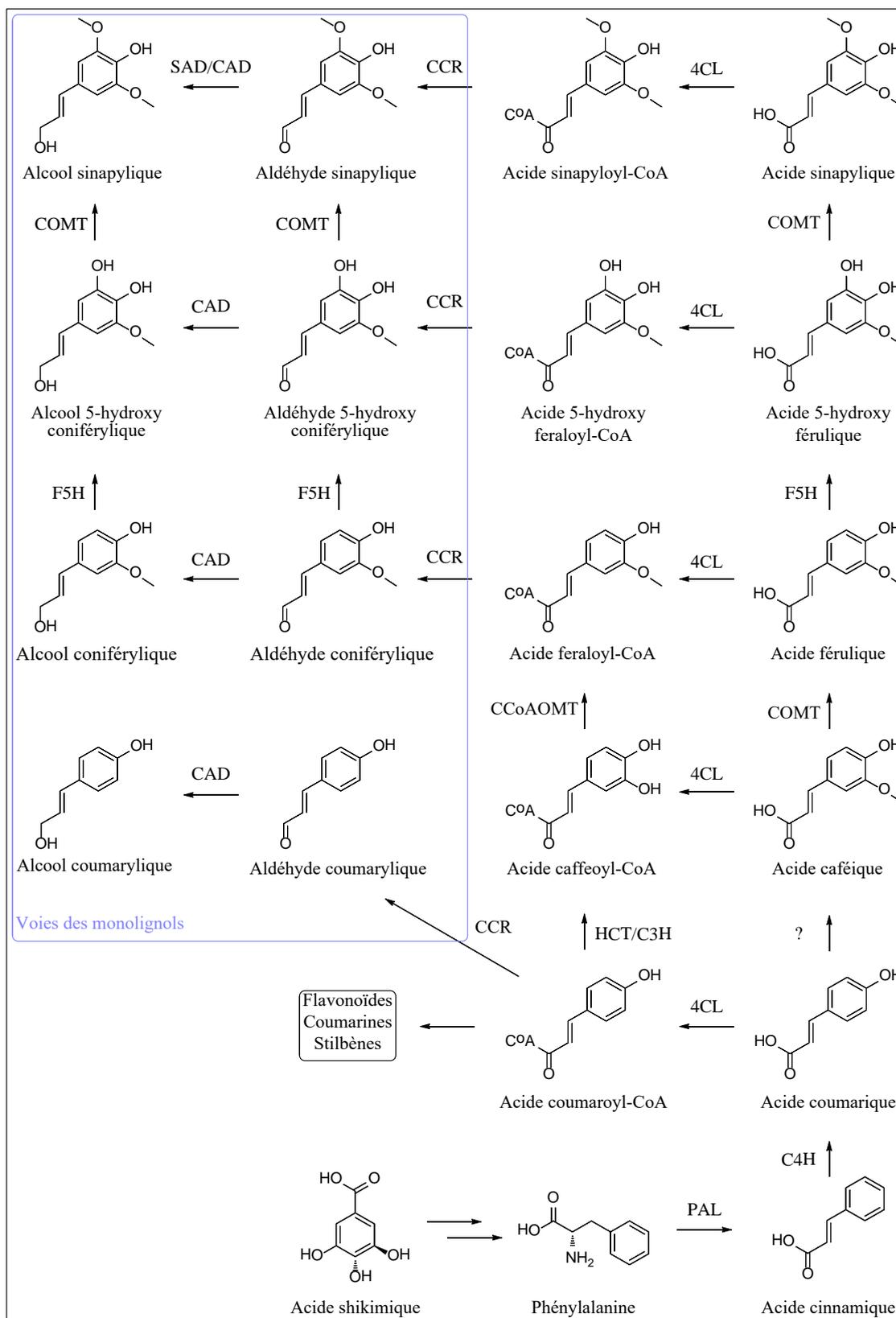


Schéma 1 : Voies de biosynthèse des phénylpropanoïdes²³.

²³ J.L. Ferrer, M.B. Austin, C. Jr. Stewart et J.P. Noel. «Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids.» *Plant Physiology and Biochemistry* **46** (2008).

Les lignanes sont des structures dimériques formées chez le lin de deux unités d'alcool coniférylique liées entre elles par leur carbone central (C8)²⁴ (Figure 4). Ils représentent une classe importante de composés²⁵ chez les plantes leur conférant des défenses contre les pathogènes²⁶. Ils présentent également des propriétés biologiques intéressantes dans les domaines de la santé et de la cosmétologie telles que la prévention de cancers, des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires¹. D'autres composés issus de la liaison de deux unités d'alcool coniférylique, appelés néolignanes, peuvent également être retrouvés dans les végétaux²⁷. Le principal lignane retrouvé dans la graine de lin est le sécoisolaricirésinol diglucoside (SDG)²⁸ formé à partir du pinorésinol *via* la pinorésinol-laricirésinol-réductase (*PLR*)⁴ (Schéma 2). Il est accumulé (jusqu'à 7,7 % de la masse sèche²⁹) dans le tégument des graines de lin avec d'autres polyphénols sous la forme d'un complexe dont les liaisons esters entre les différents composés sont assurées par l'hydroxyméthylglutarate (HMG)³⁰.

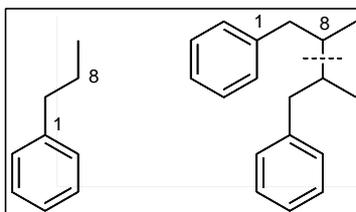


Figure 4 : Structure de base d'un lignane (couplage en C8-C8')³¹.

²⁴ S. Suzuki et T. Umezawa. «Biosynthesis of lignans and norlignans.» *Journal of Wood Science* **53** (2007): 273-284.

²⁵ D.C. Ayres et J.D. Loïke. *Lignans: Chemical, Biological and Clinical Properties*. United Kingdom: Cambridge University Press, 1990.

²⁶ C. Hano, M. Addi, L. Bensaddek, D. Cronier, S. Baltora-Rosset, J. Doussot, S. Maury, F. Mesnard, B. Chabbert, S. Hawkins, E. Lainé et F. Lamblin «Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures.» *Planta* **223** (2006): 975-989.

²⁷ O.R. Gottlieb «Chemosystematics of the lauraceae.» *Phytochemistry* **11** (1972): 1537-1570.

²⁸ L.U. Thompson, P. Robb, M. Serraino et F. Cheung. «Mammalian lignan production from various foods.» *Nutrition and Cancer* **16** (1991): 43-52.

²⁹ S. Renouard, C. Hano, C. Corbin, O. Fliniaux, T. Lopez, J. Montguillon, E. Barakzoy, F. Mesnard, F. Lamblin et E. Lainé «Cellulase-assisted release of secoisolariciresinol from extracts of flax (*Linum usitatissimum*) hulls and whole seeds.» *Food chemistry* **122** (2010): 679-687.

³⁰ C. Hano, I. Martin, O. Fliniaux, B. Legrand, L. Gutierrez, R. R. J. Arroo, F. Mesnard, F. Lamblin et E. Lainé «Pinoresinol-lariciresinol reductase gene expression and secoisolariciresinol diglucoside accumulation in developing flax (*Linum usitatissimum*) seeds.» *Planta* **224** (2006): 1291-1301.

³¹ R.D. Harworth «Natural resins.» *Annual Report on the Progress of Chemistry* **33** (1936): 266-279.

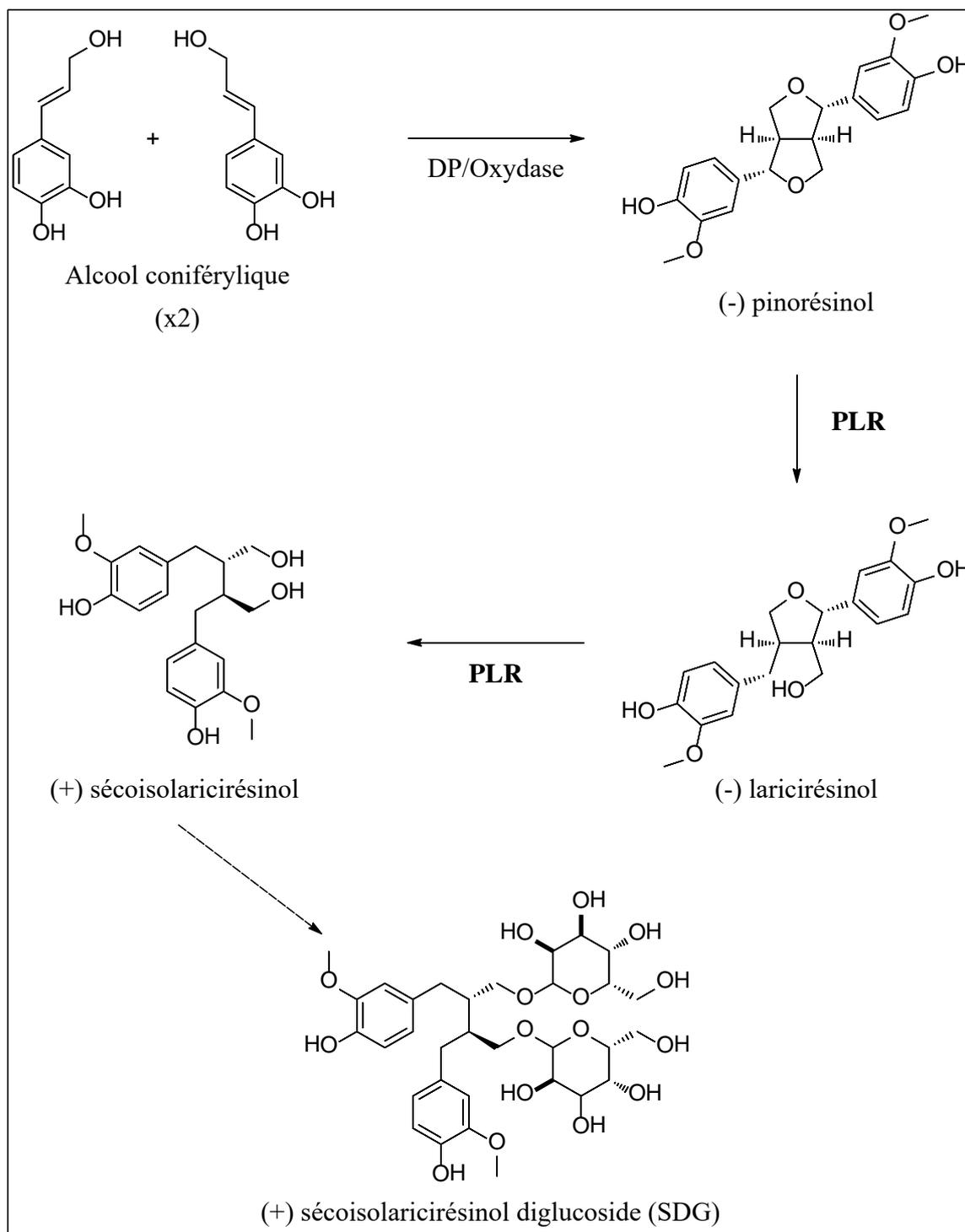


Schéma 2 : Voie de biosynthèse du SDG⁴.

Les voies de biosynthèse des lignanes et des unités G des lignines présentant un précurseur commun sont susceptibles d'être soumises à des mécanismes de régulations qui leur sont communs également. De nombreuses enzymes sont impliquées dans ces voies de biosynthèse et ont déjà été étudiées de façon à comprendre leurs mécanismes d'action et de régulation notamment au niveau de la férulate-5-hydroxylase (F-5-H) et de la *PLR*.

La F-5-H permet d'initier la synthèse des unités S de la lignine à partir d'une unité de coniféraldéhyde qui lui-même est à l'origine de la formation de l'alcool coniférylique et donc de la voie de biosynthèse des lignanes. Cette enzyme est une monooxygénase cytochrome P450-dépendante. Il a été montré à plusieurs reprises que l'augmentation de son expression induisait une modification du phénomène de lignification avec une augmentation du nombre d'unités S chez différentes espèces végétales^{32,33}. Cependant les effets de l'augmentation de l'expression de ce gène sur la production des lignanes n'ont pas été étudiés.

La *PLR* est l'enzyme la plus importante qui entre en jeu dans la synthèse du SDG, elle permet la transformation du pinorésinol en laricirésinol puis du laricirésinol en sécoisolaricirésinol⁴.

³² F. Rochus., C.M. McMichael, K. Meyer, A.M. Shirley, J.C. Cusumano et C. Chapple. «Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate-5-hydroxylase.» *The Plant Journal* **22** (2000): 223-234.

³³ R. Vanholme, B. Demedts, K. Morrel, J. Ralph et W. Boerjan. «Lignin Biosynthesis and Structure.» *Plant Physiology* **153** (2010): 895-905.

B. Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

a. Graines issues de différentes lignées de lins

L'essentiel des travaux est effectué à partir de graines issues de l'espèce *Linum usitatissimum*, le lin cultivé (cultivar Barbara) et de lignées transgéniques issues de cette même variété. Les graines ARNi *PLR*, sont obtenues à partir de plantes transgéniques inhibant l'expression de la *PLR1*. Dans cette étude, 4 lignées ARNi *PLR* (Pi1AK, Pi1AM, Pi1Y et Pi1AJ), avec 6 individus par lignées, sont comparées à une lignée témoin (*LuT*) présentant également 6 individus. Les graines *F-5-H +* sont obtenues à partir de plantes transgéniques surexprimant le gène *F-5-H* de peuplier (*Populus nigra*). Dans cette étude, 5 mutants *F-5-H +* (F1, F3, F4, F5 et F6) seront comparés à un témoin de la variété Barbara à travers différentes approches. Ces plantes ont été transformées par l'équipe d'Eric Lainé, à l'antenne scientifique universitaire de Chartres, Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures UPRES EA 1207 de l'Université d'Orléans^{34,35}.

b. Graines de lin de différentes variétés cultivées

Les graines ont été fournies par le semencier Laboulet. Différentes variétés (dont le nom a été codé) ont été sélectionnées en fonction de leur teneur en acide gras et plus particulièrement en acide α -linoléique. Les différentes caractéristiques de ces graines sont référencées dans le Tableau 4.

³⁴ Hano, Christophe. «Régulation de la biosynthèse des lignanes chez le lin oléagineux (*Linum usitatissimum*).» Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'Université d'Orléans, 2005.

³⁵ Renouard, Sullivan. «Régulation transcriptionnelle de la biosynthèse des lignanes du lin (*Linum usitatissimum* et *Linum flavum*) et amélioration de l'extraction des lignanes.» Thèse de doctorat, Orléans, 2011.

Tableau 4 : Caractéristiques des différentes variétés de graines de lin³⁶. Les abréviations FT, TI et HT correspondent respectivement à faible teneur, teneur intermédiaire et haute teneur en ω -3. Chacun des codes correspond à une variété.

Groupe	Variétés Semencier	% ω -3	Groupe	Variétés Semencier	% ω -3	Groupe	Variétés Semencier	% ω -3
FT	L198.56.4	3,01	TI	JL472.57	51,05	HT	HL644.10	62,14
	HL100.42	1,54		HL599.24	55,27		HVL7.9C	62,54
	LINOLA 95.1	8,49		IL548.30	55,68		ASTRAL	62,5
	GL531.30 Pep	9,26		HL666.41	56,28		HVL6.31A	62,66
	GL531.30 Essai	9,26		GL594.15	56,53		HVL7.9B	62,82
	GEMINI Essais	9,94		HL602.5	56,77		HVL6.53A	63,11
	L100.42	N.D.		GL664.5	56,81		HVL6.31.14	63,29
L198.56	N.D.	HL661.74		56,93	HVL7.29C		63,42	
		HL548.30 Essai		N.D.	GL706.92		63,71	
		HL472.57		N.D.	LUTEA Pep		63,93	
		FL640.31		N.D.	LUTEA Essai		63,93	
					HVL2.34		67,87	
					GL536.21		N.D.	
					L308.15.8		N.D.	

2. Analyse des acides gras par RMN HR MAS

L'analyse par RMN HR MAS est réalisée à l'aide d'un spectromètre Bruker DRX-500 MHz équipé d'une sonde HR MAS 4 mm. Le rotor de 4 mm de diamètre est taré de façon à pouvoir peser une masse précise de glycérol (environ 5 mg, selon les échantillons) qui sert de référence. Deux graines de lin entières et non broyées sont ensuite placées dans le rotor puis 35 μ L de D₂O sont ajoutés dans le rotor afin de pouvoir régler le champ magnétique³⁷. Les spectres sont traités à l'aide du logiciel Topspin 3.0 : l'identification est réalisée par comparaison avec des spectres de témoins d'acides gras et la quantification est réalisée après déconvolution des spectres. L'analyse spectrale consiste en l'expérience suivante (Tableau 5) :

³⁶ Ramsay, Aina. «Développement d'outils de métabotypage pour l'étude de la biosynthèse de substances naturelles : Application à l'étude de la biosynthèse des lignanes de la graine de lin.» Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'Université Picardie Jules Verne, 2011.

³⁷ H.Fast Seefeldt, F.Hoffman Larsen, N.Viereck, M.Agerlin Engelsen et S.Balling Petersen. «Lipid composition and deposition during grain filling in intact barley (*Horedum vulgare*) mutant grains as studied by 1H HR MAS NMR.» Journal of Cereal Science 54 (2011): 442-449.

Tableau 5 : Séquence RMN de l'analyse HR MAS.

Séquence	Paramètres d'acquisition	
¹³ C-quantitatif	Mode d'acquisition	Qsim
	Nombre de points (TD)	64 K
	Nombre de scans (ns)	1024
	Fenêtre spectrale (SW)	221
	ppm	
	Temps d'acquisition (AQ)	1,18
s		
	Délai de relaxation (D1)	40 s

Les temps de relaxation ont été préalablement mesurés de façon à obtenir un spectre carbone qui soit quantitatif.

3. Extraction et analyse du mucilage

Le mucilage des graines entières (200 mg) est extrait par 5 mL d'eau dans un bain-marie à 80°C sous agitation pendant 1 h. L'ajout de 15 mL d'isopropanol glacial à l'extrait aqueux (préalablement séparé des graines) permet ensuite de précipiter le mucilage et de s'affranchir des autres composés extraits tels que les protéines. Le mucilage est ensuite dissout dans 5 mL d'eau distillée puis lyophilisé et repris dans de l'eau UHQ pour atteindre une concentration de 2 g.L⁻¹. Une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) 4 M est ajoutée à cette solution mucilagineuse puis chauffée à 100°C dans un bain à sec pendant 4 h afin d'hydrolyser les polysaccharides et de pouvoir analyser leur composition en oses neutres et en oses acides. L'hydrolysate est ensuite séché puis repris dans 1 mL d'eau UHQ et à nouveau séché. Cet hydrolysate est alors repris dans l'eau UHQ à une concentration de 0,5 g.L⁻¹ puis 20 µL de cette solution filtrée sur 0,2 µm sont injectés et analysés sur un ensemble Dionex DX-500 composé d'un détecteur électrochimique ED50, d'une pompe à gradient GP 50 et d'un passeur d'échantillon AS50. Les oses neutres et acides sont séparés sur une colonne Carbopac PA 1 (4 x 250 mm) précédée d'une précolonne Carbopac PA (4 x 50 mm) thermostatées à 30°C. Les gradients utilisés pour la séparation des oses font intervenir 4 éluants : l'éluant A (eau ultra pure), l'éluant B (NaOH à 160 mM), l'éluant C (acétate de sodium à 600 mM + NaOH à 160 mM) et l'éluant D (NaOH à 200 mM). La séparation des oses acides et des oses neutres est effectuée à un débit de 1 mL.min⁻¹ par deux programmes d'élution distincts.

La séparation des oses neutres est obtenue sous flux isocratique pendant 25 min avec 90 % de A et 10 % de B suivi d'un palier à 100 % de D entre 25 et 36 min. La colonne est ensuite stabilisée pendant 14 min en utilisant le mélange d'éluion : 90 % de A et 10 % de B.

Pour les oses acides, la séparation débute avec l'éluant B à 100 % pendant 5 min suivi d'un gradient d'éluant C variant de 0 % à 100 % sur 30 min. Après un palier de 5 min avec 100 % d'éluant C, la colonne est rééquilibrée avec 100 % de l'éluant B pendant 10 min.

Afin de déterminer la concentration de chacun des oses composant le mucilage, les aires ont été intégrées à l'aide du logiciel Chromeleon (Dionex) et rapportées à des courbes de standards établies pour le glucose, le rhamnose, le xylose, le fucose, le galactose, l'arabinose et l'acide galacturonique.

4. Broyage et extraction hydro-alcoolique des métabolites des graines

Avant extraction, les graines (150 mg) sont broyées à l'aide d'un vibrobroyeur RETSCH® pendant 20 min à 100 Hz. Les graines broyées (100 mg) sont ensuite extraites au bain-marie à 60°C pendant 30 min sous agitation par 1,5 mL d'un solvant deutéré composé de 750 μ L de méthanol-d₄, de 15 μ L de NaOD 10 N et de 735 μ L de tampon phosphate deutéré pH = 6 contenant 0,1 % de tétraméthylsilane (TSP). L'extrait obtenu est alors neutralisé par 20 μ L de DCI 7 N et séparé du broyat par 15 min de centrifugation à 14000 rpm et à 4°C. Le surnageant correspondant à l'extrait brut est ensuite analysé par RMN et par CLHP³⁶.

5. Analyse métabolomique par RMN de la fraction hydro-alcoolique

L'extrait brut est ajusté à pH = 6 ($\pm 0,05$) avant d'être analysé par RMN par un spectromètre BRUCKER Avance III 600 MHz équipé d'une sonde TXI de 5 mm. La référence externe est le TSP et la calibration du champ est réalisée sur le signal du solvant. Après une transformée de Fourier avec une multiplication exponentielle (LB = 0,3), l'alignement et le phasage des spectres protons (NOESY) par rapport au TSP sont réalisés manuellement sur le logiciel Topspin 3.0. Les spectres sont alors découpés en buckets de 0,04 ppm à l'aide du logiciel Amix 9.1, puis les données obtenues sont traitées par une analyse multivariée à l'aide du logiciel SimcaP12. Les spectres NOESY permettent d'obtenir les données de quantification des composés. Les spectres J-resolved et HSQC permettent l'identification des composés à l'aide des spectres de bases de données et de différents témoins analysés dans les mêmes conditions. L'analyse spectrale est réalisée sur les séquences suivantes (Tableau 6):

Tableau 6 : Séquences RMN pour l'analyse métabolomique.

Séquences	Paramètres d'acquisition		
NOESY (présaturation pic de l'eau) ¹ H	1D		
	Mode d'acquisition	DQD	
	Angle de basculement	90°	
	Nombre de points (TD)	128 K	
	Nombre de scans (ns)	128	
	Fenêtre spectrale (SW)	14 ppm	
	Temps d'acquisition (AQ)	7,8 s	
	Délai de relaxation (D1)	7 s	
J-resolved ¹ H	F1	F2	
	Mode d'acquisition	DQD	
	Angle de basculement	90°	
	Nombre de scans (ns)	4	
	Délai de relaxation (D1)	11 s	
	Nombre de points (TD)	32	64 K
	Fenêtre spectrale (SW)	0.08 ppm	14 ppm
	Temps d'acquisition (AQ)	0,32 s	3,89 s
HSQC ¹ H ¹³ C	F1	F2	
	Mode d'acquisition	DQD	
	Délai de transfert (2*D4)	0,00345 90°	
	Angle de basculement	64	
	Nombre de scans (ns)	1,5 s	
	Délai de relaxation (D1)		
	Nombre de points (TD)	256	1024
	Fenêtre spectrale (SW)	200 ppm	14 ppm
	Temps d'acquisition (AQ)	0,004 s	0,061 s

6. Quantification par CLHP des lignanes et de leurs précurseurs

L'extrait brut est filtré sur 0,45 μm puis 20 μL de cet extrait sont injectés sur un ensemble Dionex Ultimate 3000 composé d'un passeur d'échantillon WPS-3000, d'une pompe à gradient DGP 3600 BM, d'un four à colonne TCC 3x00 et d'un détecteur à barrette de diodes 3000. Les différents composés phénoliques sont séparés sur une colonne C_{18} -alkyle amide Supelco® ABZ+ Plus (5 μm , 250x4,6 mm) précédée d'une précolonne C_{18} (Waters, $\mu\text{bondapack}$, 10 μm). Le gradient d'éluion est réalisé à l'aide de deux éluants : l'éluant A (eau ultrapure + 0,2 % d'acide acétique glacial) et l'éluant B (acétonitrile).

La séparation des lignanes et de leurs précurseurs est réalisée à un débit de 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Elle débute par un gradient de 0 % à 18 % d'éluant B sur 20 min et fait ensuite intervenir un palier à 18 % d'éluant B durant 15 min durant lequel la majorité des composés d'intérêts sont élués. Afin d'éluier les autres composés restés fixés sur la colonne, un premier gradient variant de 18 % à 35 % d'éluant B sur 20 min suivi d'un second gradient variant de 35 % à 50 % d'éluant B sur 25 min sont mis en place. La colonne est alors rééquilibrée par 100 % d'éluant A pendant 10 min³⁸.

Afin d'évaluer la teneur en $\mu\text{moles}\cdot\text{g}^{-1}$ de masse sèche des différents composés, l'aire des pics est intégrée et rapportée à des courbes étalons pour l'acide coumarique glycosylé (CAG), l'acide caféique glycosylé (CAFG), l'acide férulique glycosylé (FAG), le pinorésinol diglucoside (PDG), le sécoisolaricirésinol diglucoside (SDG) et l'herbacétine diglucoside (HDG). Les résultats présentés font ensuite l'objet d'un test statistique de type Mann-Whitney ($p < 0,05$).

³⁸ Beejmohun, Vickram., 2007. Optimisation de la production de lignanes chez le lin - Etude de la régulation de leur biosynthèse à l'aide de précurseurs marqués. Thèse de doctorat de l'Université Picardie Jules Verne.

C. Résultats

En raison des faibles quantités de graines disponibles pour l'étude des lignées *F-5-H +* et ARNi *PLR*, tous les dosages n'ont pas pu être réalisés pour chacune d'entre elles. Pour les 33 variétés de graines fournies par Laboulet, seule l'analyse du mucilage a été réalisée car les données sur les autres composants avaient déjà été mesurées précédemment³⁶.

1. Analyse du contenu en acides gras de graines de lins issues de plantes transgéniques

Classiquement, l'analyse des acides gras est réalisée par GC-MS. En raison des faibles quantités de matériel végétal disponibles, l'analyse non-destructrice par RMN haute résolution à l'angle magique (HR MAS) a été utilisée pour analyser des acides gras contenus dans les graines.

L'analyse des acides gras des différentes graines de lin a été réalisée à partir de spectres RMN ¹³C HR MAS dont un exemple est présenté en Figure 5.

Les résultats obtenus sont les ratios « acide linoléique/acide linoléique » et acide oléique/acide linoléique calculés (cf. tableau 2) à partir de l'intégration des aires des pics A16 ($\delta = 32$ ppm), B10 + B12 ($\delta = 128$ ppm) et C15 ($\delta = 127$ ppm).

Pour les graines ARNi *PLR* et *F-5-H +*, l'analyse des acides gras n'a été réalisée qu'une fois sans réplicat biologique. Les résultats sont préliminaires et leur analyse permet éventuellement de présenter des hypothèses mais en aucun cas d'établir des conclusions définitives.

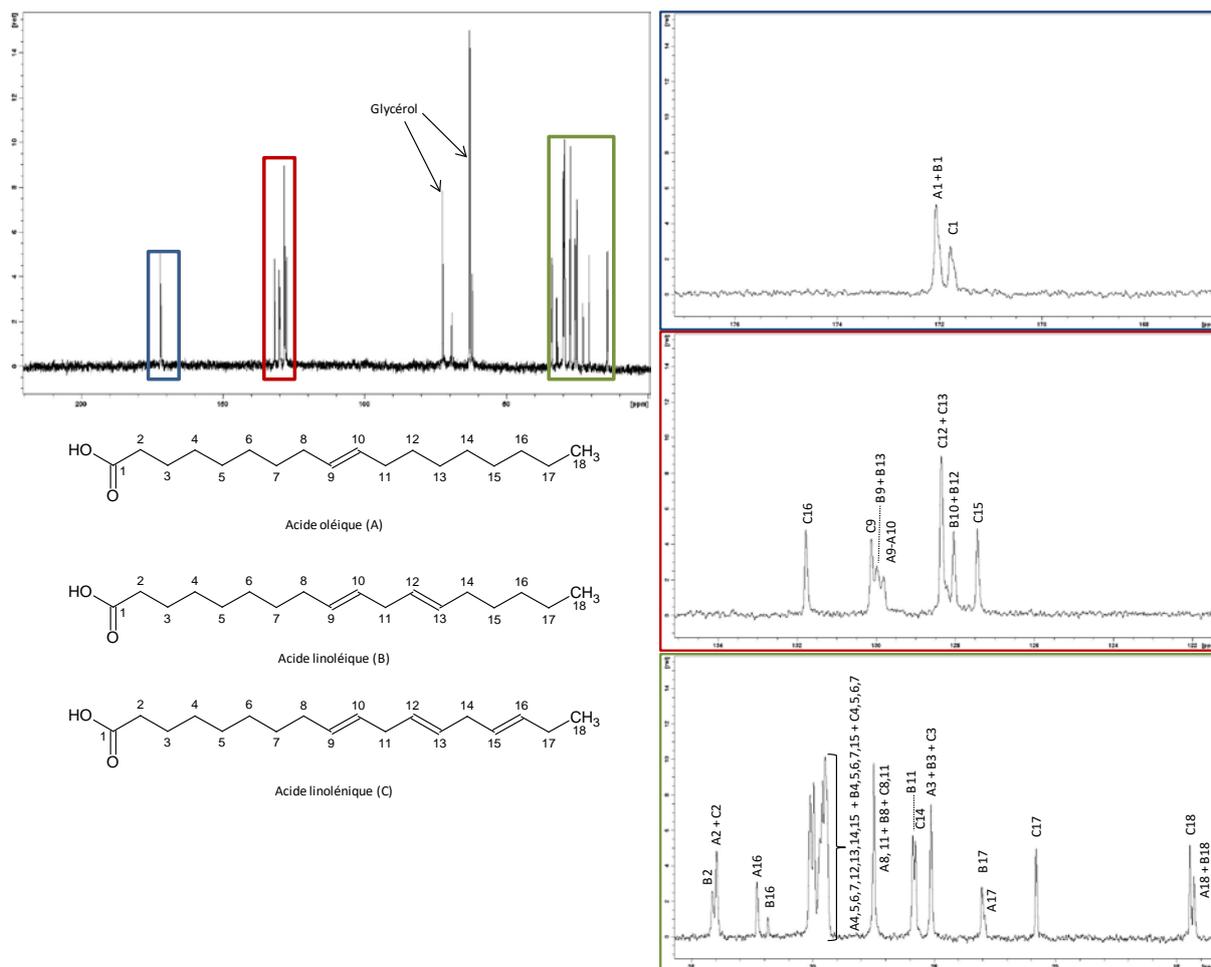


Figure 5 : Exemple d'un spectre ^{13}C RMN HR MAS obtenu pour l'analyse des acides gras des différentes graines étudiées. Les noms attribués à chacun des pics indiquent par la lettre l'acide oléique (A), l'acide linoléique (B) et l'acide linoléique (C). Les chiffres correspondent aux carbones de ces différents composés.

a. Détermination des proportions d'acides gras dans les graines ARNi PLR

L'analyse de la composition en acides gras des graines ARNi PLR est présentée en Figure 6. L'inhibition du gène codant pour la PLR ne semble pas avoir d'effets sur la composition de l'huile des graines. Le ratio acide linoléique/acide linoléique reste stable dans chacune des lignées présentées (entre 0,49 et 0,58). Le ratio acide oléique/acide linoléique reste stable entre les lignées LuT, Pi1AK, Pi1AM et Pi1AJ (entre 0,62 et 0,76). En revanche ce ratio est augmenté dans la lignée Pi1Y à 0,96.

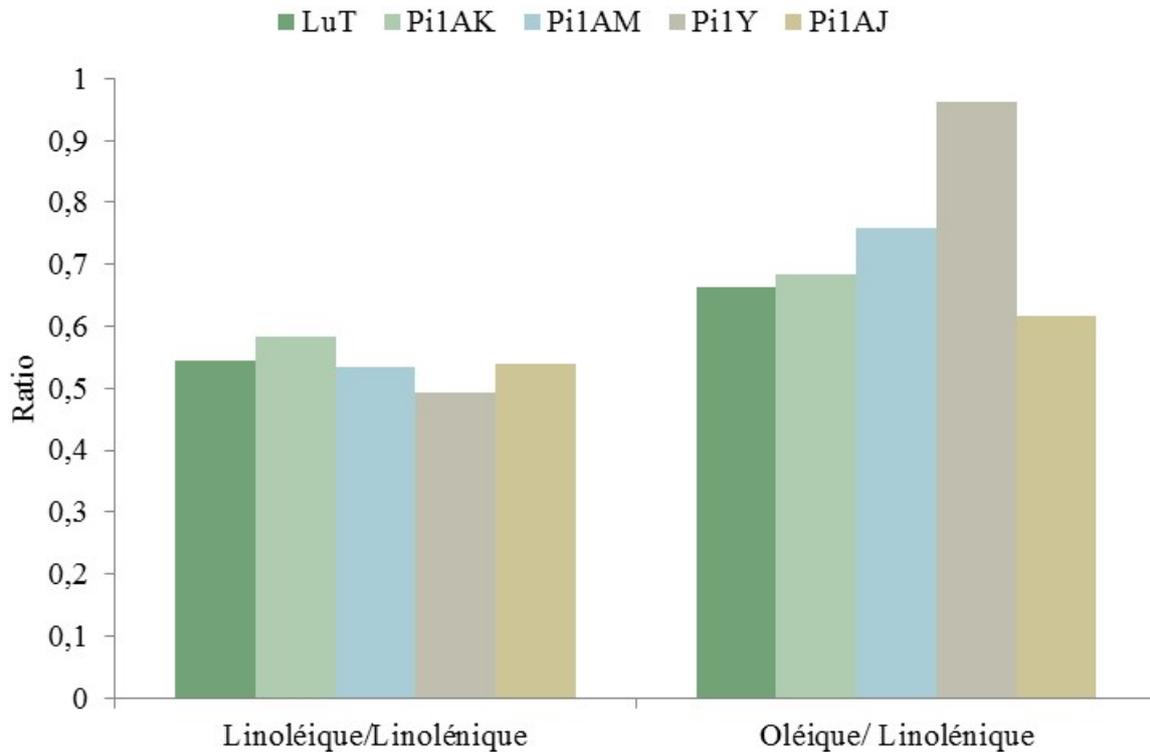


Figure 6 : Histogramme présentant les valeurs des différents ratios entre les acides gras présents dans les graines témoin *LuT* et ARNi *PLR* (Pi1AK, Pi1AM, Pi1Y et Pi1AJ).

b. Détermination des proportions d'acides gras dans les graines F-5-H +

L'analyse de la composition en acides gras des graines *F-5-H +* est présentée dans la Figure 7.

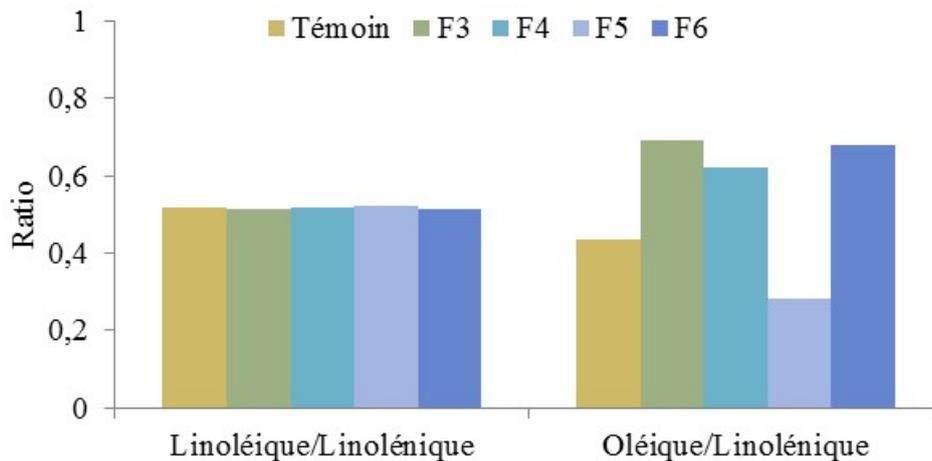


Figure 7 : Histogramme présentant les valeurs des différents ratios entre les acides gras présents dans les graines témoins Barbara et *F-5-H +* (F3, F4, F5, F6).

Le ratio acide linoléique/acide linoléique reste stable dans toutes les lignées étudiées (entre 0,51 et 0,52). Le ratio acide oléique/acide linoléique semble être modifié par l'augmentation de l'expression du gène codant pour la F-5-H. Le ratio du témoin Barbara vaut

0,44. Il est augmenté dans les lignées F3, F4 et F6 respectivement à 0,69, 0,62 et 0,68 et diminué dans la lignée F5 à 0,28.

2. Analyse de la composition du mucilage des graines issues des lignées F-5-H + et des 33 variétés de lins cultivées

a. Etude préliminaire de la corrélation existant entre la composition du mucilage et la teneur en oméga 3 de graines de différentes variétés de lin cultivées

La Figure 8 représente les relations entre le pourcentage en acide linoléique présent dans l'huile de lin et la composition du mucilage des graines.

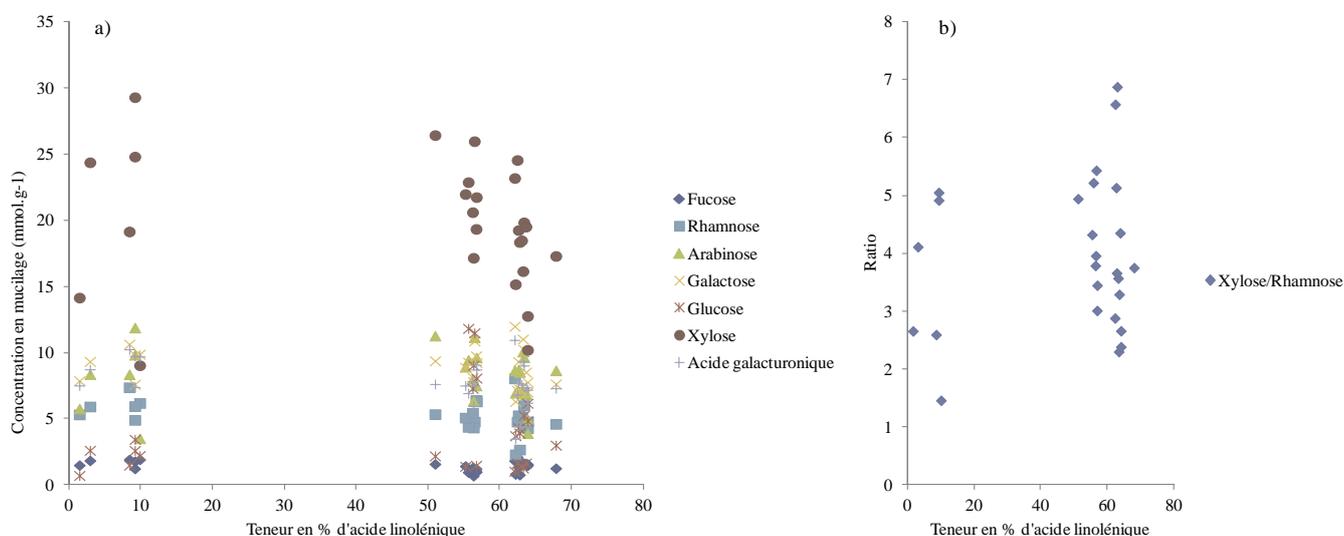


Figure 8 : a) Représentation graphique des corrélations entre la teneur de 26 variétés de graines de lin en acide linoléique et la composition en fucose, rhamnose, arabinose, galactose, glucose, xylose, acide galacturonique de leur mucilage b) et entre l'acide linoléique et leur ratio xylose/rhamnose.

Les résultats obtenus sont en accord avec les données retrouvées dans la littérature (Tableau 3). En effet, des quantités importantes de xylose sont observées par rapport aux autres oses. Les proportions entre chacun des sucres sont respectées. Cette représentation montre qu'il n'y a pas de corrélation marquée entre la teneur en acides gras et la composition du mucilage de ces différentes variétés de graines lin. En effet, pour chacun des oses composant le mucilage étudiés séparément aucune augmentation ou diminution corrélée à la teneur en acide linoléique n'est observable. Le ratio xylose/rhamnose permettant d'évaluer le rapport entre les fractions acide et neutre du mucilage n'évolue pas non plus en corrélation avec la teneur en ω -3. Aucune corrélation n'est donc observable entre le mucilage et les acides gras ω -3 des graines de lin que ce soit d'un point de vue quantitatif ou qualitatif.

3. Etude préliminaire de la composition du mucilage chez les lignées de lins transgéniques *F-5-H +*

Sur la Figure 9, sont reportées les teneurs de chacun des oses composant le mucilage de lin pour chacun des échantillons testés. Les expériences n'ont pu être réalisées qu'une fois en raison de la faible quantité de matériel disponible ; ces résultats sont donc préliminaires et seule une tendance pourra en être dégagée.

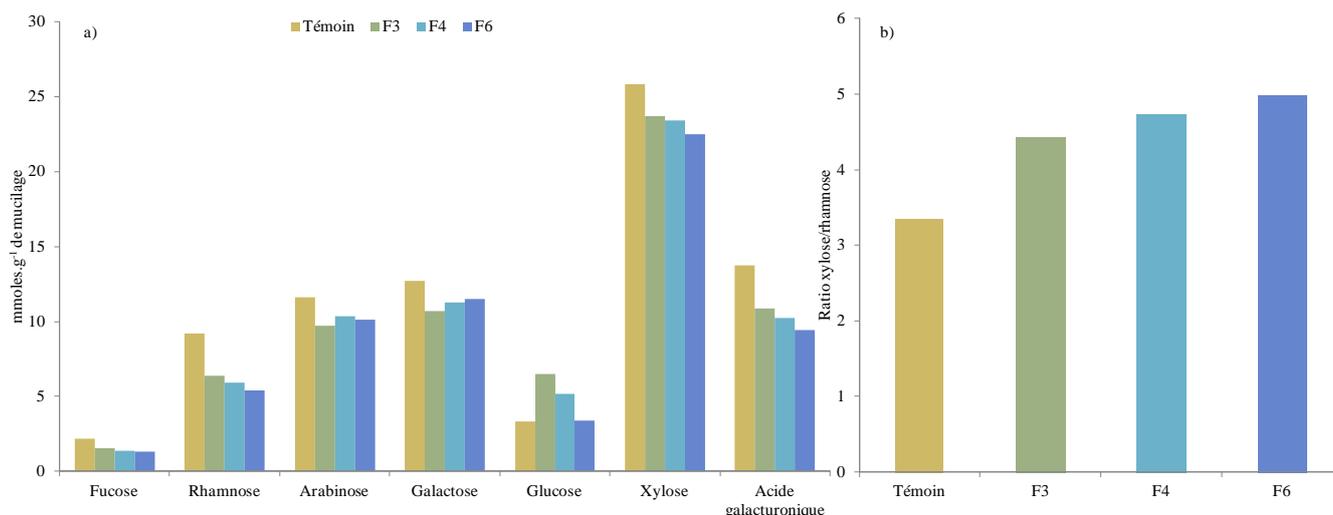


Figure 9 : a) Composition du mucilage pour le témoin Barbara et pour les mutants *F-5-H +* (F3, F4, F6) représentée par la teneur en chacun des oses le composant b) et par le ratio xylose/rhamnose.

Ces différents histogrammes ne montrent aucune différence marquée pour chaque ose étudié entre les graines issues du témoin Barbara et les graines mutées *F-5-H +*. Pour chacun des oses hormis le glucose, l'observation d'une légère diminution de leur quantité dans le mucilage des graines *F-5-H +* pouvait être observée. Les ratios xylose/rhamnose permettent d'évaluer la proportion de la fraction acide du mucilage par rapport à celle de la fraction neutre. Les mutants F3, F4 et F6 présentent respectivement une augmentation de 32 %, 41 % et 48 % de ce ratio par rapport au témoin. Ce résultat permet d'émettre l'hypothèse qu'un remaniement de la structure mucilagineuse s'opère dans ces graines *F-5-H +*.

4. Etude métabolomique de la fraction hydro-alcoolique extraite des graines de lins transgéniques

a. Etude métabolomique par RMN 1H

· Graines ARNi PLR

Dans le cadre de l'étude métabolomique des graines ARNi PLR, les données obtenues en RMN (Figure 10) sont traitées par une analyse en composante principale. Les scores obtenus sont présentés sur la Figure 11.

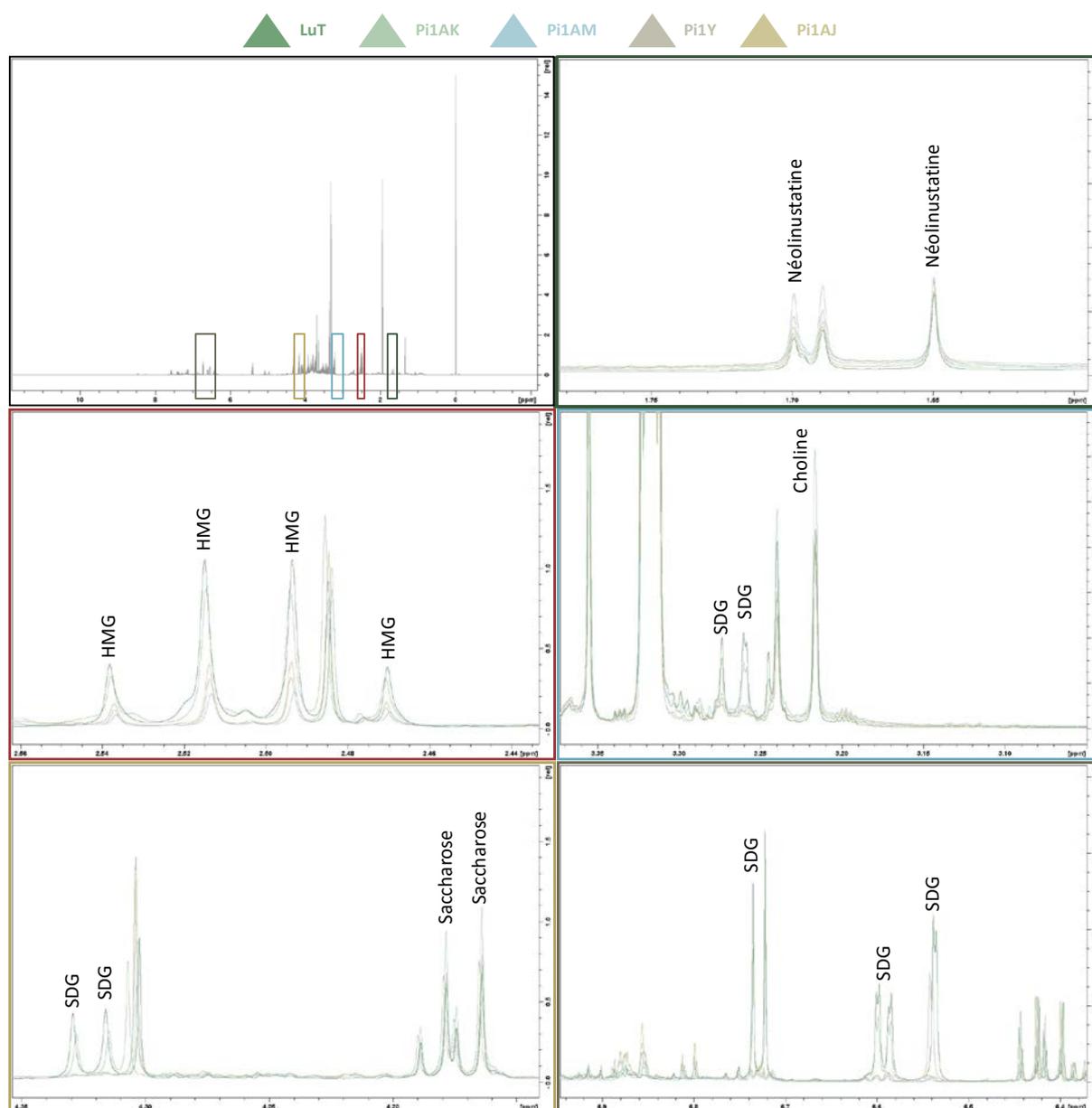


Figure 10 : Spectre ^1H obtenu à partir des extraits des différentes lignées de graines ARNi PLR et agrandissements des zones discriminantes. HMG : hydroxyméthylglutarate, SDG : sécoisolaricirésinol diglucoside.

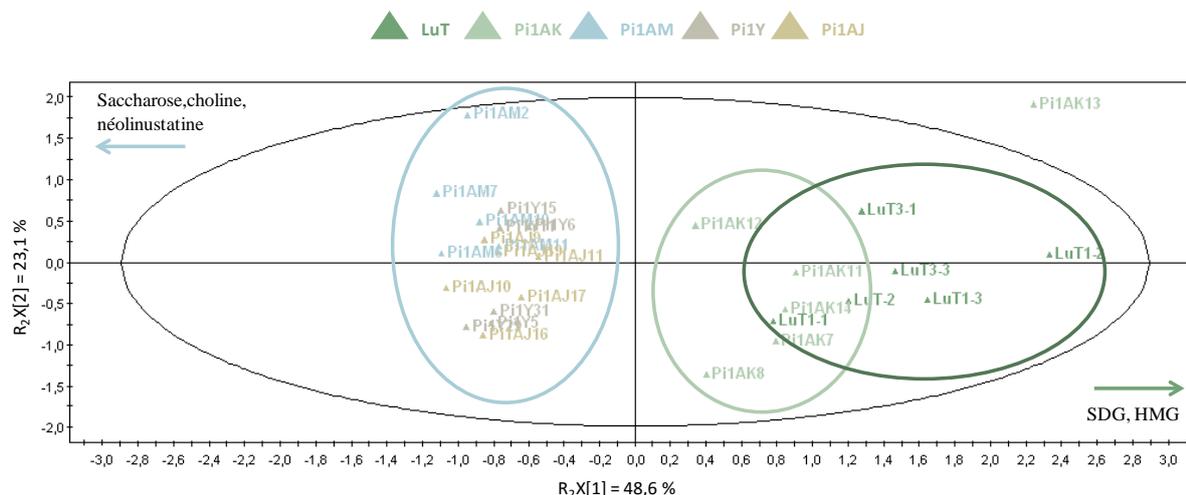


Figure 11 : Diagramme de score de l'analyse par composante principale des 5 lignées *LuT*, *Pi1AK*, *Pi1AM*, *Pi1Y*, *Pi1AJ* (Echelle Pareto, $R_2(\text{Cum}) = 0,48$, $Q_2(\text{Cum}) = 0,36$).

Cette analyse permet de séparer de façon distincte les lignées *Pi1AM*, *Pi1Y* et *Pi1AJ* de la lignée témoin *LuT*. En revanche, la lignée *Pi1AK* n'est pas séparée de cette lignée témoin lors de cette analyse.

La discrimination entre les différentes lignées étudiées est réalisée par une analyse en composante principale. Les données spectrales traitées permettent de déterminer quels sont les pics discriminants et d'évaluer les différences quantitatives existant pour chacun de ces pics. Une fois l'identification de ces pics réalisée, une analyse statistique de type Kruskal & Wallis (Excel) est ensuite réalisée pour ces composés discriminants ($p < 0,05$). Les différentes zones spectrales permettant la discrimination des lignées étudiées entre elles sont exposées dans la figure 13.

Cette analyse révèle une diminution de 95 % de la quantité de SDG dans les graines ARNi *PLR* hormis dans la lignée *Pi1AK* pour laquelle cette diminution n'est que de 34 %. La quantité de HMG est également diminuée dans ces graines de 63 % en moyenne sauf pour la lignée *Pi1AK* (diminution de 8 %). Une augmentation de saccharose de 21 % en moyenne est observée dans toutes les lignées ARNi *PLR*. La quantité de choline présente dans les graines augmente de 9 %, 36 %, 19 % et 18 % respectivement dans les lignées *Pi1AK*, *Pi1AM*, *Pi1Y* et *Pi1AJ*. La teneur en néolinustatine, composé cyanogénétique, augmente également de 3 %, 51 %, 21 % et 17,2 % pour ces mêmes lignées.

• *Graines F-5-H +*

La quantité de graines disponible pour les différentes lignées *F-5-H +* n'a permis de réaliser qu'une extraction pour chacune des lignées. Dans ce cadre, une analyse ACP n'est pas envisageable. Ces résultats sont préliminaires et ne peuvent apporter qu'un aperçu des

éventuelles modifications du métabolome s'opérant lors de l'augmentation de l'expression du gène codant pour la F-5-H. Pour toutes les lignées *F-5-H* +, les composés discriminants varient de la même façon par rapport au témoin Barbara comme le montre la Figure 12.

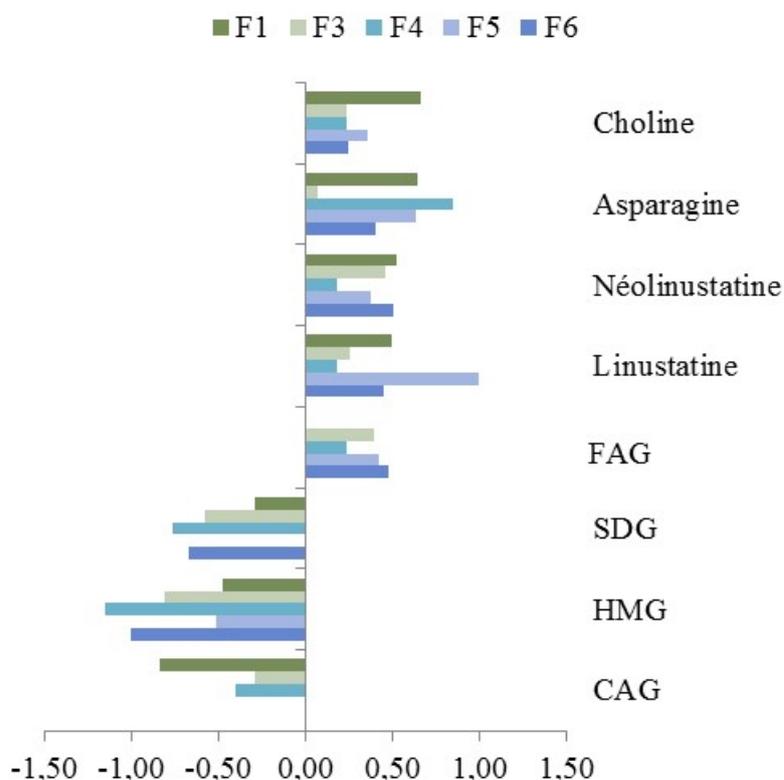


Figure 12 : Indication des différents composés discriminants les graines *F-5-H* + selon la lignée dont elles sont issues. Les barres représentent le ratio en log2 entre l'intégration des pics du spectre RMN ¹H pour chacune des lignées *F-5-H* + (F1, F3, F4, F5, F6) et celle pour le témoin Barbara. FAG : acide férulique glycosylé, SDG : sécoisolaricirésinol diglucoside, HMG : hydroxyméthylglutarate, CAG : acide coumarique glycosylé.

L'augmentation de l'expression du gène codant pour la F-5-H semble induire une augmentation des teneurs en choline, en asparagine, en néolinustatine, en linustatine et en FAG dans les graines. En revanche, les quantités de SDG, d'HMG et de CAG semblent diminuer. Bien que les métabolites discriminants soient les mêmes pour toutes les lignées, les variations observées pour chacune d'entre elles sont différentes. Par exemple, dans le cas de la linustatine une augmentation de 14 % par rapport au témoin Barbara est observée pour la lignée F4 alors qu'elle est de 100 % pour la lignée F5. Ce type de disproportions peut être retrouvé pour chacun des composés décrits. Dans quelques lignées, la teneur de certains de ces composés n'est pas modifiée par la mutation. C'est le cas de l'acide férulique dans la lignée F1, du SDG et du CAG dans la lignée F5 et du CAG dans la lignée F6.

Les différents spectres RMN ^1H permettant l'identification des composés discriminants sont exposés dans la Figure 13.

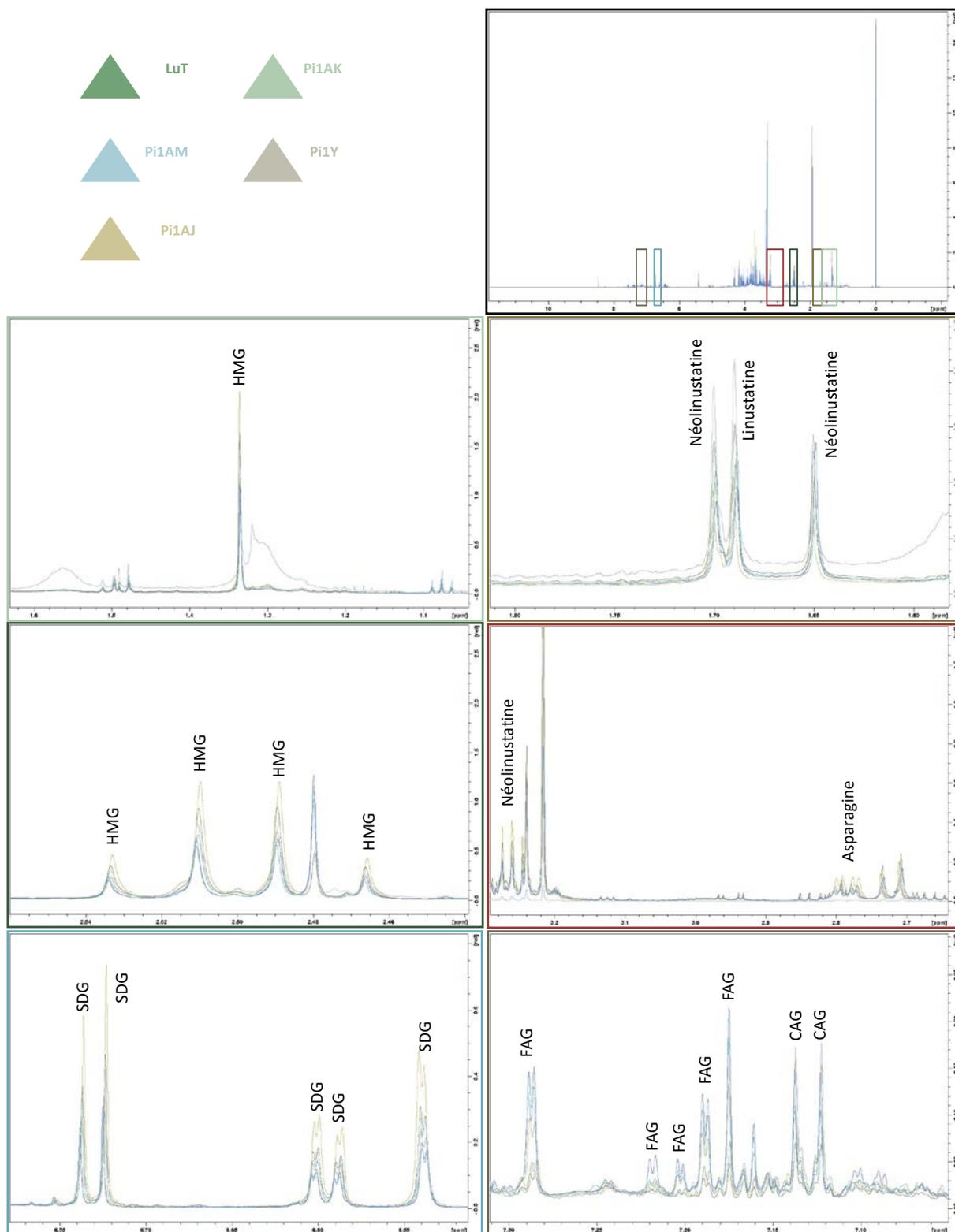


Figure 13 : Spectres RMN ^1H obtenus à partir des extraits des différentes lignées de graines *F-5-H* + et agrandissements des zones discriminantes. HMG : hydroxyméthylglutarate, SDG : sécoisolaricirésinol diglucoside, FAG : acide férulique glycosylé, CAG : acide coumarique glycosylé.

b. Quantification des lignanes et de leurs précurseurs

L'analyse ciblée par CLHP des lignanes, des néolignanes, des acides hydroxycinnamiques et du principal flavonoïde (HDG) aboutit à différents chromatogrammes présentés dans la Figure 14.

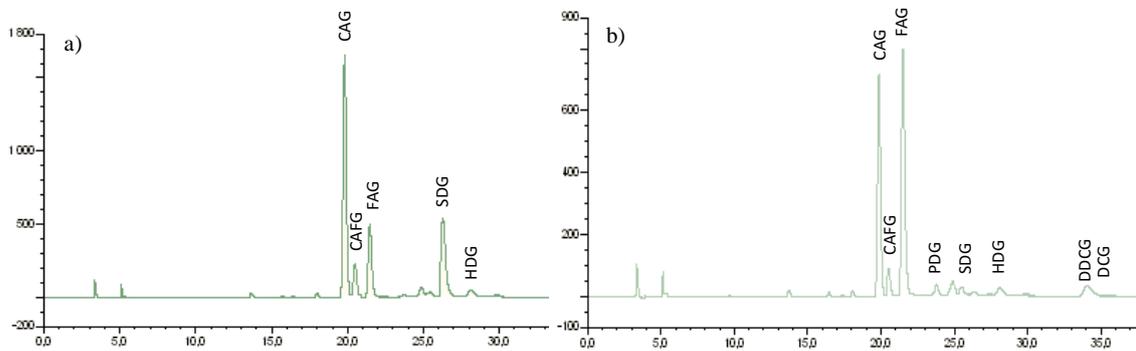


Figure 14 : Exemples de chromatogrammes obtenus par analyse CLHP pour la lignée témoin *LuT* (a) et pour la lignée ARNi *PLR Pi1AM* (b).

• Graines ARNi *PLR*

La Figure 15 présente les résultats obtenus par cette analyse de ces différents métabolites qui composent le complexe dans les graines ARNi *PLR*. L'analyse est menée sur 4 lignées de graines issues de plantes transgéniques et la lignée témoin cultivées en serres. Chaque lignée est représentée par 6 individus.

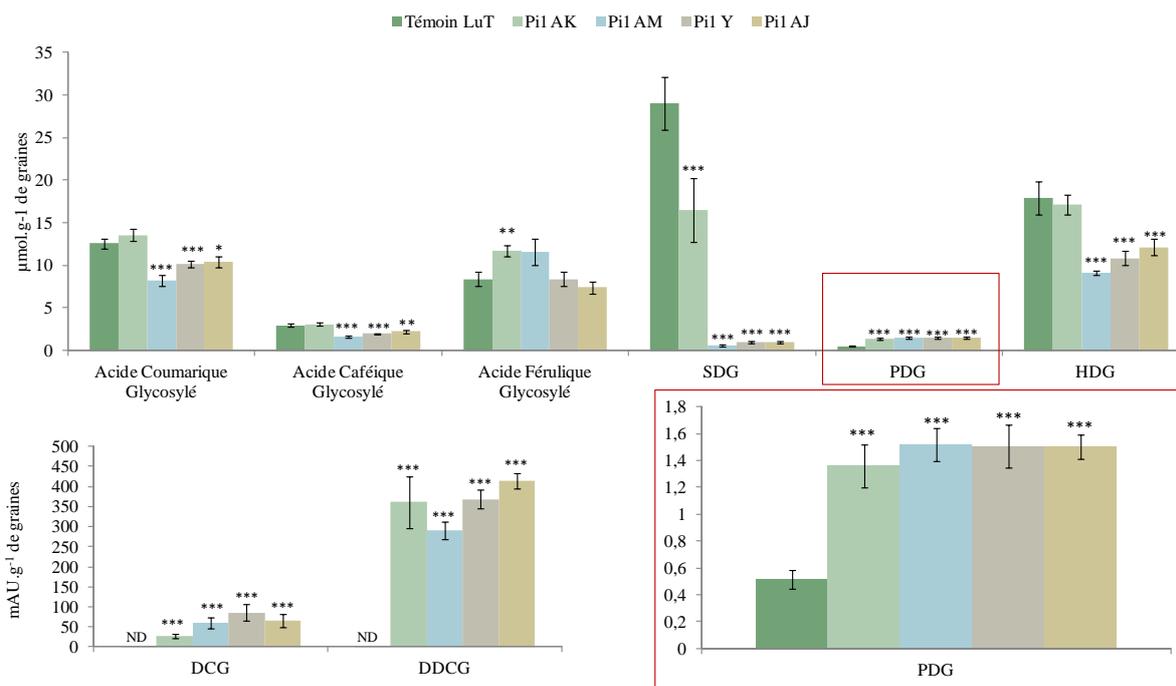


Figure 15 : Représentation des teneurs des différents composants du complexe dans les graines de lin témoin et ARNi *PLR*. La barre d'erreur représente l'erreur standard (n = 6). Le test statistique est donné par : * pour p<0,05, ** pour p<0,025 et *** pour p<0,01. SDG : sécoisolaricirésinol diglucoside, PDG : pinorésinol diglucoside, HDG : herbacétine diglucoside, DCG : alcool déhydrodiconiférylique, DDCG : alcool dihydrodihydrodiconiférylique, ND : Non Détecté. Témoin Barbara et lignées transgéniques : Pi1AK, Pi1AM, Pi1Y, Pi1AJ.

Les composés étudiés sont les composants du complexe : acides coumarique, caféique et férulique glycosylés, le SDG et le PDG (formes glycosylées des lignanes sécoisolaricirésinol et du pinorésinol), l'alcool déhydrodiconiférylique (DCG) et l'alcool dihydrodihydrodiconiférylique (DDCG) (néolignanes issus de l'alcool coniférylique) et l'herbacétine diglucoside (HDG) (flavonoïde issu de l'acide coumarique). Pour les acides hydroxycinnamiques, le SDG, le PDG et l'HDG, la quantification est réalisée à partir de standards commerciaux ou de témoins purifiés disponibles au laboratoire. Pour le DCG et le DDCG les teneurs relatives sont exprimées en mAU.g⁻¹ de graines car il n'existe pas de standards commerciaux permettant une quantification absolue et leur purification n'est pas encore terminée.

L'analyse des graines ARNi *PLR* montre un remaniement important des voies de biosynthèse des phénylpropanoïdes et des lignanes. Les teneurs en acide coumarique sont diminuées dans les lignées Pi1AM, Pi1Y et Pi1AJ respectivement de 34 %, 19 % et 17 % par rapport à la lignée témoin mais aucune différence n'est observée pour la lignée Pi1AK. Ce schéma se reproduit pour les teneurs en acide caféique avec une diminution de 44 %, 32 % et 24 % dans les lignées Pi1AM, Pi1Y et Pi1AJ et aucune différence significative pour la lignée

Pi1AK. En revanche, la teneur en acide férulique de cette lignée augmente de 39 % alors qu'elle reste stable dans les graines témoins.

Le SDG tend à disparaître du métabolome de la graine dans les différentes lignées cependant la diminution de la quantité de ce composé est moins marquée dans la lignée Pi1AK. La teneur en SDG dans celle-ci est diminuée de 43 % alors que la diminution observée dans les graines Pi1AM, Pi1Y et Pi1AJ est proche de 100 %. Inversement, la teneur en PDG, forme d'accumulation du pinorésinol (précurseur de la biosynthèse du sécoisolaricirésinol), dans les graines ARNi *PLR* augmente de 163 % dans les graines Pi1AK et de 192 % en moyenne dans les autres lignées.

L'inhibition de l'expression du gène de la *PLR* induit l'apparition de néolignanes habituellement non détectés dans les graines Barbara. Ainsi, la synthèse de DCG et de DDCG a pu être mise en évidence pour la première fois dans des lignées ARNi *PLR*. De la même façon que pour les composés décrits précédemment, le DCG et le DDCG semblent s'accumuler de manière moins marquée dans la lignée Pi1AK.

La modification de la voie de biosynthèse des lignanes au niveau du gène de la *PLR* entraîne également des modifications au niveau de la voie des flavonoïdes (*HDG*) dont l'évolution de la teneur est aussi représentée sur la figure 18. La teneur en *HDG* diminue dans les lignées Pi1AM, Pi1Y et Pi1AJ de 50 %, 40 % et 34 %. Aucune modification de cette teneur n'est observée dans la lignée Pi1AJ.

• *Graines F-5-H +*

De la même façon que pour l'étude de la composition du mucilage et l'étude métabolomique des graines *F-5-H +*, la quantification des lignanes et de leurs précurseurs n'a été réalisée qu'une fois ; ces résultats sont donc préliminaires et seule une tendance pourra en être dégagée. La figure 19 présente les teneurs de graines des acides coumarique, caféique et férulique glycosylés, du SDG et de l'*HDG*.

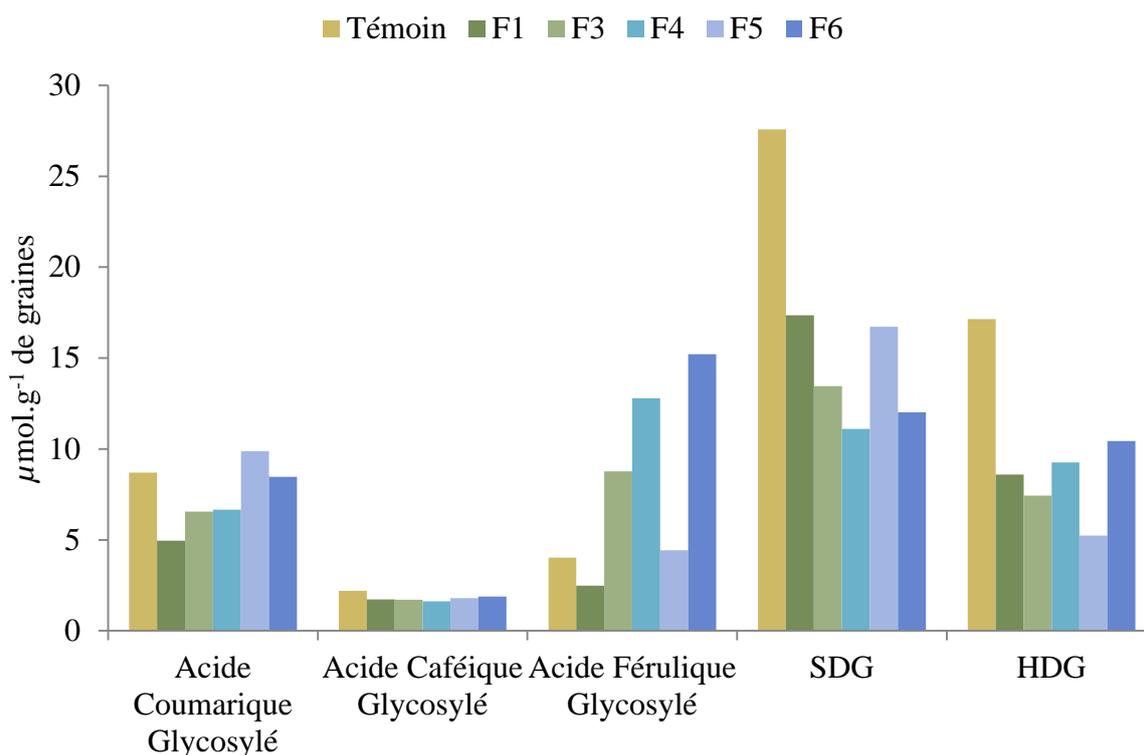


Figure 16 : Représentation des teneurs des différents composants du complexe dans les graines de lin témoin Barbara et *F-5-H +* (F1, F3, F4, F5, F6). SDG : sécoisolaricirésinol diglucoside, PDG : pinorésinol diglucoside, HDG : herbacétine diglucoside.

La teneur en acide coumarique diminue nettement dans les mutants F1, F3 et F4 respectivement de 43 %, 25 % et 23 % ; elle diminue de façon moins franche dans le mutant F6 (3 %). En revanche, elle est augmentée dans les mutants F5 de 14 %. La teneur en acide caféique diminue dans tous les mutants étudiés par rapport au témoin de 16 % à 26 %. La teneur en acide férulique augmente dans les mutants F3, F4, F5 et F6 respectivement de 118 %, 118 %, 10 % et de 278 %. Cependant, elle diminue de 38 % dans le mutant F1. En ce qui concerne le SDG et l'HDG, leurs teneurs respectives diminuent dans tous les mutants. Dans le cas du SDG, la diminution de la teneur varie entre 37 % et 60 % et dans le cas de l'HDG la diminution de la teneur varie entre 39 % et 69 %.

Pour l'ensemble des mutants *F-5-H +*, aucune corrélation n'est établie entre la diminution ou l'augmentation de chaque métabolite. En effet, la teneur en acide coumarique semble diminuer dans le mutant F1 et augmenter dans le mutant F5. En revanche dans ces mêmes mutants, la teneur en SDG semble diminuer de façon similaire. Ce phénomène s'observe pour l'ensemble des mutants et des métabolites.

D. Discussion

1. 33 variétés non discriminées par la composition de leur mucilage

Les précédents travaux réalisés au sein du laboratoire ont montré une corrélation entre la teneur en ω -3 et la teneur des produits composant le complexe présents dans les graines de 33 variétés différentes de lins cultivés³⁶. Ainsi, une augmentation de la teneur en CAG, FAG, et CAFG ainsi qu'en SDG et PDG peut être corrélée à une diminution de la teneur en ω -3, et inversement une augmentation de la teneur en HDG, Kaeampférol diglucoside (KDG) et diméthylherbacétine (HME) est corrélée à une augmentation de la teneur en ω -3. Afin de comprendre les relations existantes entre les composants de l'ensemble de la graine, une étude de la composition du mucilage a donc été entreprise. Des travaux récents sur l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*, qui présente une voie de biosynthèse des lignanes proche de celle du lin, ont mis en évidence qu'une diminution de la production de mucilage chez des plantes transgéniques induisait une augmentation de la production d'huile dans leurs graines³⁹.

Les résultats présentés dans ce document ne montrent cependant aucune corrélation entre la composition du mucilage et le contenu en ω -3 (Figure 11). Cependant, les mesures n'ayant été réalisées qu'une seule fois, les travaux seront approfondis afin de confirmer ces résultats. Des travaux réalisés au Canada sur différentes variétés de lin avaient été réalisés afin de déterminer quels sont les paramètres influençant la composition de la graine de lin et avaient abouti à la conclusion que la teneur en mucilage n'était pas corrélée à la teneur en huile de la graine⁴⁰ ce qui corrobore les résultats obtenus.

La différence entre ces résultats et ceux obtenus pour *A.thaliana* peut s'expliquer soit par les différences métaboliques existants entre ces deux espèces soit par le fait que le gène faisant l'objet de la mutation dans l'étude de Shi *et al.*, 2012³⁹ agit, en conditions sauvages, sur la voie de biosynthèse du mucilage en l'activant et sur la voie de biosynthèse des acides gras en l'inhibant. Cette corrélation entre la teneur en acide gras et la teneur en mucilage ne pourrait donc être observée qu'en modifiant l'expression de ce gène *glabra2*.

³⁹ L. Shi, V. Katavic, Y. Yu, L. Kunst, et G. Haughn. «*Arabidopsis glabra2* mutant seeds deficient in mucilage biosynthesis produce more oil.» *The Plant Journal* 69 (2012): 37-46.

⁴⁰ A. Diederichsen, J.P. Raney et S.D. Duguid. «Variation of Mucilage in Flax Seed and Its Relationship with Other Seed Characters.» *Crop Science* 46 (2006): 365-371.

2. Réorganisations métaboliques dans les plantes transgéniques pour la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes

L'analyse métabolomique entreprise sur les graines issues de plantes transgéniques ARNi *PLR* et *F-5-H* + a permis d'évaluer l'impact de ces transformations génétiques sur le métabolome et plus particulièrement sur les teneurs en métabolites composant le complexe ainsi que sur les teneurs en acides gras et la composition en mucilage.

L'étude de ces graines a consisté en une analyse métabolomique par RMN ¹H des extraits hydro-alcooliques de graines. Les résultats obtenus de cette analyse permettent de déterminer quels sont les principaux composés dont les teneurs varient dans les graines issues des plantes transgéniques par rapport aux graines issues des plantes témoins. A partir de ces résultats, une analyse par CLHP-UV ciblée sur les métabolites composant le complexe a été entreprise permettant de mettre en évidence des variations de teneurs pour des métabolites non détectés en RMN ¹H. L'extraction hydro-alcoolique n'étant pas la méthode de choix pour l'analyse du mucilage et des acides gras, ceux-ci sont analysés de façon ciblée respectivement par HPAEC et RMN HR MAS de façon à compléter les résultats obtenus par l'analyse métabolomique.

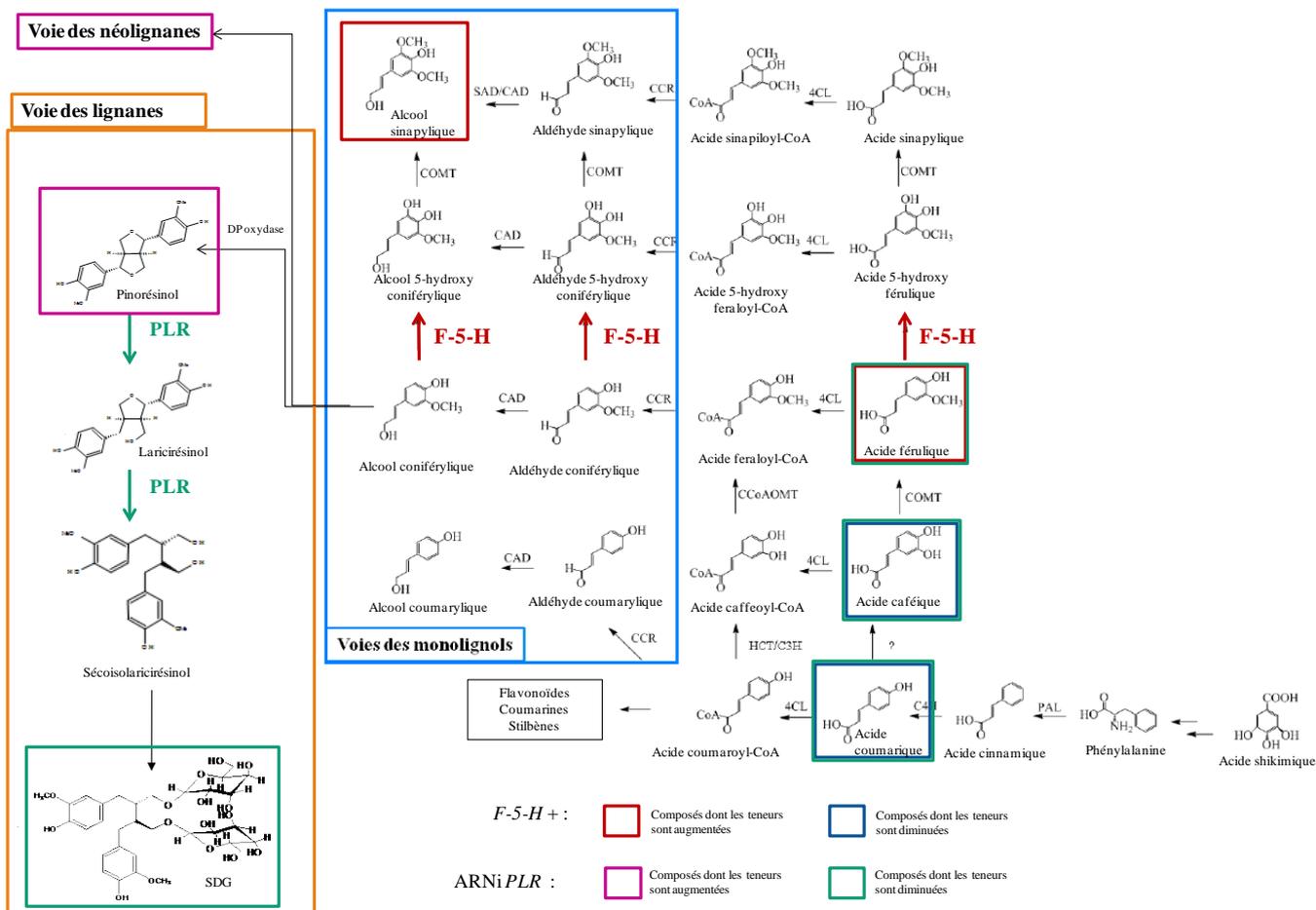


Figure 17 : Figure récapitulative des effets observés dans les graines des lins transgéniques étudiées au niveau de la voie des phénylpropanoïdes

a. Influence de l'inhibition de l'expression du gène codant pour la PLR sur le métabolome

Bien que les voies métaboliques aboutissant à la synthèse des lignanes chez le lin soient maintenant bien décrites, le rôle de ces métabolites dans la plante reste encore indéfini même si un rôle dans les mécanismes de défenses de la plante a déjà été proposé. Afin de comprendre le rôle de ces composés, une étude du métabolome des graines de plantes transgéniques inhibant l'expression du gène codant pour la PLR a été entreprise. La PLR est l'enzyme permettant la biosynthèse du SDG, principal lignane accumulé dans les graines de lin. Les résultats issus de cette analyse métabolomique montrent des remaniements importants au niveau de la teneur des lignanes et des phénylpropanoïdes (Figure 17). Différentes lignées ARNi PLR ont été étudiées et pour chacune d'entre elles les résultats observés sont similaires. La lignée Pi1AK présente cependant une réorganisation métabolique moins marquée que dans les autres lignées ; ce phénomène peut s'expliquer par l'expression différentielle du gène codant pour la PLR dans chacune des lignées dont la mesure a été réalisée par l'équipe d'Eric Lainé, à l'antenne

scientifique universitaire de Chartres. Les résultats obtenus lors de cette mesure sont exposés dans la Figure 18. Celle-ci montre effectivement que l'expression du gène codant pour la PLR est inhibée dans toutes les lignées étudiées mais qu'elle reste 2 fois plus importante dans la lignée Pi1AK que dans la lignée Pi1AM.

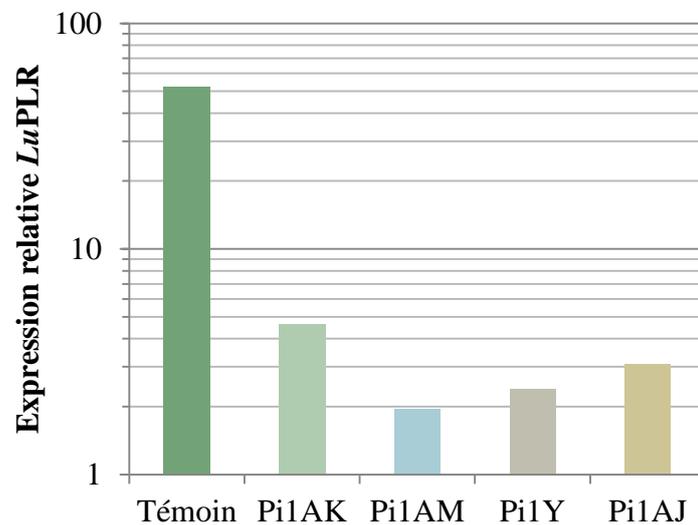


Figure 18 : Représentation de l'expression en log10 du gène *PLR* dans le témoin Barbara et dans les différentes lignées ARNi *PLR* (Pi1AK, Pi1AM, Pi1Y, Pi1AJ).

Les résultats obtenus lors de cette analyse métabolomique montrent que la mutation du gène codant pour la PLR entraîne une forte diminution du contenu en SDG dans les graines. Ce résultat suggère qu'aucune autre voie métabolique ne permet de pallier cette diminution de SDG. Que deviennent alors les précurseurs du SDG ? Permettent-ils de compenser son absence ? Et d'autres métabolites sont-ils synthétisés afin de remplacer le SDG pour son rôle dans la plante ?

L'analyse métabolomique montre que le pinorésinol, précurseur du SDG, est accumulé sous une forme diglucosylée qu'est le PDG. En effet, la teneur en PDG dans les graines est quasiment multipliée par 3 par rapport à celle mesurée dans les graines témoin ; cependant les quantités atteintes ($1,5 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de graine) sont très éloignées de celles obtenues pour le SDG dans les plantes non transformées ($30 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de graine). L'accumulation de PDG ne compense donc que très partiellement l'absence de SDG. Les résultats montrent également que les quantités de tous les autres constituants du complexe diminuent. Ces résultats peuvent permettre de poser l'hypothèse que la présence du SDG est indispensable à la formation de ce complexe. La diminution de la formation du complexe rendrait alors inutile la synthèse de composés impliqués dans sa formation et pourrait alors expliquer la diminution de la teneur en CAG, FAG, HDG et HMG.

L'analyse CLHP permet de détecter la présence de DCG et de DDCG dans les graines ARNi *PLR* et non détectables dans les graines témoins. Ces composés sont des néolignanes issus de la liaison en 5-8' de deux unités d'alcool coniférylique. Leur présence a été mise en évidence dans des cultures cellulaires de lin⁴¹. Leur accumulation en quantités importantes dans les graines ARNi *PLR* permet d'émettre l'hypothèse que la plante redirige l'alcool coniférylique vers une voie de biosynthèse habituellement peu exprimée pour éviter une accumulation inhabituelle de PDG

L'analyse métabolomique révèle également l'augmentation de 3 autres métabolites: le saccharose, la choline et la néolinustatine. Bien que ces variations restent actuellement difficilement interprétables cela permet de souligner que le rôle de la *PLR* ne se limite pas à la voie de la biosynthèse des lignanes. La mutation du gène codant pour la *PLR* conduit à une réorganisation de la teneur de composés de voies métaboliques très éloignées.

b. Influence de la surexpression du gène codant pour la F-5-H sur le métabolome

Les quantités disponibles de matériel végétal F-5-H + n'ont permis de réaliser qu'une étude préliminaire du métabolome des graines de lin. Les résultats, restant à confirmer, donnent cependant une idée de l'influence d'une augmentation de l'expression du gène codant la F-5-H sur l'ensemble du métabolome. Les profils d'expression de ces transgènes ont été réalisés par l'équipe d'Eric Lainé et sont présentés dans la Figure 19. Ils ont permis de s'assurer que le gène codant la F-5-H est bien surexprimé dans les lignées F3, F5 et F6.

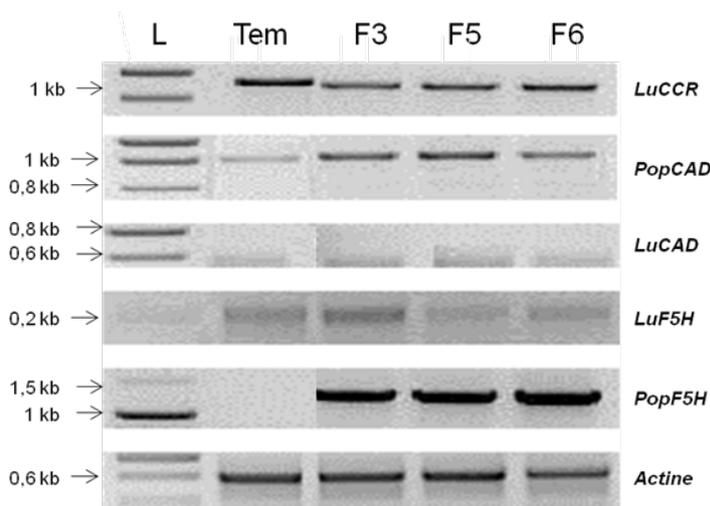


Figure 19 : Expression des transgènes *popCAD* et *popF5H* et des gènes endogènes *LuCCR*, *LuCAD* et *LuF5H* déterminée par RT-PCR semi quantitative pour le témoin Barbara et les lignées *F-5-H* + F3, F5 et F6. Le gène actine sert de gène de référence.

⁴¹ J.Attoumbre, C.Hano, F.Mesnard, F.Lamblin, L.Bensaddek, S.Raynaud-Le Grandic, E.Lainé, M.A.Fliniaux et S.Baltora-Rosset. «Identification by NMR and accumulation of a neolignan, the dehydrodiconiferyl alcohol-4-B-D-glucoside, in *Linum usitatissimum* cell cultures.» *Compte-Rendus Chimie* 9 (2006): 420-425.

L'étude métabolomique de la fraction hydroalcoolique extraite de ces graines montre ainsi une diminution de la quantité de SDG (Figure 17), d'acides coumarique et caféique glycosylés et d'HDG qui sont des composants du complexe. La diminution de la teneur en SDG peut s'expliquer par une métabolisation plus importante du coniféraldéhyde pour former du 5-hydroxyconiféraldéhyde *via* la F-5-H dont l'expression est augmentée. Cette voie aboutit à la formation d'alcool synapylique dont les teneurs sont également augmentées dans les graines *F-5-H +* comme le montre la figure 23 (résultats des travaux de l'équipe d'Eric Lainé).

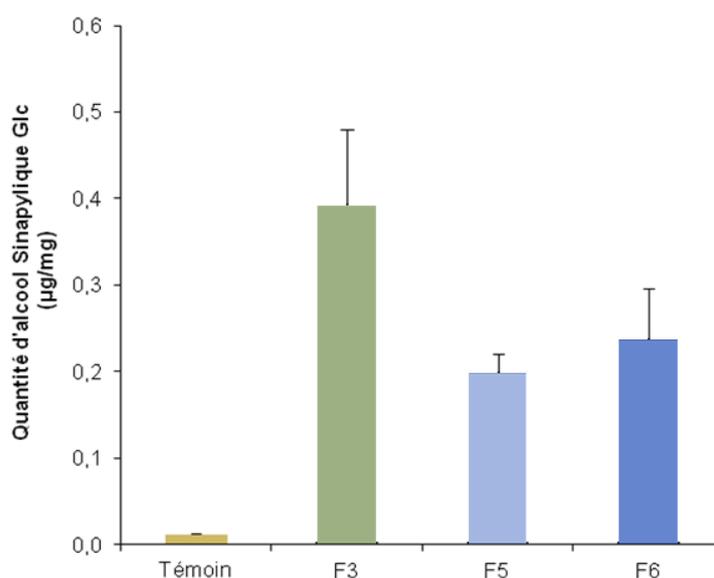


Figure 20 : Evolution des quantités d'alcool sinapylique dans les lignées *F-5-H +* F3, F5 et F6 et le témoin Barbara (n=3).

La formation de l'alcool synapylique pourrait donc s'effectuer au détriment de celle de l'alcool coniférylique et du SDG. La diminution des autres composés cités précédemment peut s'expliquer par l'hypothèse exposée dans le cas des graines ARNi *PLR* à savoir que la diminution de la teneur en SDG diminuerait la formation du complexe et par conséquent l'accumulation des acides hydroxycinnamiques et de l'HDG. Cependant, l'acide férulique semble augmenter dans les graines *F-5-H +* ce qui ne corrobore pas cette hypothèse.

Pour finir, des modifications (variables selon les lignées) sont également observées au niveau de la composition en acides gras des graines de lin. Le manque de données ne permet pas de conclure définitivement à ce sujet et il est difficile d'établir une relation de cause à effets entre les acides gras et les phénylpropanoïdes puisqu'ils ne sont pas localisés dans les mêmes tissus et ne sont pas synthétisés aux mêmes périodes de développement.

E. Conclusion et perspectives

L'étude de graines issues de lins transgéniques surexprimant le gène codant l'enzyme F-5-H ou inhibant le gène codant pour l'enzyme PLR ont permis d'évaluer l'impact de ces enzymes sur l'ensemble du métabolome de la plante. L'étude métabolomique par RMN ¹H suivie d'études plus ciblées par CLHP et RMN HR MAS de ces graines a abouti à différents résultats permettant d'appréhender les mécanismes mis en place au niveau de ces voies de biosynthèse ainsi que les relations existant avec d'autres voies plus ou moins éloignées.

Lors de ces travaux, il est apparu que la diminution de SDG, principal lignane accumulé dans la graine est corrélée à la diminution des autres composants du complexe dans les plantes transgéniques étudiées. Au contraire, il a été constaté la synthèse originale de néolignanes dans les graines. Ces composés n'existant pas dans les plantes témoins sont intégrés au complexe. Par ailleurs, une augmentation de la teneur en composés cyanogéniques (graines F-5-H et ARNi PLR), métabolites impliqués dans les mécanismes de défense de la plante, a été observée. Ces résultats permettent d'émettre différentes hypothèses quant au rôle du SDG dans la plante et aux mécanismes de cette voie de biosynthèse. La plante ne semble pas mettre en place de voie métabolique permettant de compenser la synthèse défaillante de SDG. A la lumière de ces résultats, le SDG semble être indispensable à la mise en place du complexe puisque sa diminution est corrélée à la diminution des autres composants de ce complexe. L'augmentation des teneurs en composés impliqués dans les mécanismes de défenses de la plante pourrait être due à une réaction de celle-ci pour compenser le manque de SDG ou de complexe. Cette dernière hypothèse tendrait à supporter l'idée que soit le SDG soit le complexe soit les deux ont un rôle dans les mécanismes de défense de la plante.

Les voies de biosynthèse des phénylpropanoïdes et des lignanes aboutissent à la production de métabolites secondaires non essentiels au développement de la plante en accord avec l'impact relativement faible de la modification de ces enzymes sur l'ensemble du métabolome. Cependant bien que ces modifications n'aient pas de répercussions importantes sur le phénotype de la plante, les résultats obtenus montrent que des modifications au niveau de cette voie de biosynthèse entraînent des remaniements métaboliques à des niveaux relativement éloignés et même au niveau de métabolites primaires. Ces résultats ont été publiés dans *Journal of plant physiology* en 2014 (cf. Annexe).

Afin de confirmer les hypothèses proposées et de compléter les résultats obtenus, l'étude de ces plantes transgéniques devra être approfondie de différentes manières. Tout d'abord, les

graines F-5-H et ARNi PLR devront être produites en quantités suffisantes afin de pouvoir confirmer ces analyses métabolomiques. Ensuite l'analyse des acides gras par RMN HR MAS pourra être réalisée de façon à doser de manière absolue la quantité de chacun des acides gras présents. Enfin, la voie des phénylpropanoïdes aboutissant également à la production des lignines au niveau de la tige, l'analyse métabolomique des parties aériennes et des racines de ces plantes transgéniques pourra être envisagée afin de compléter de manière la plus exhaustive possible les résultats obtenus lors de ce travail. La proximité des voies de biosynthèse des lignanes et des lignines permet d'émettre un certain nombre d'hypothèses quant à la biosynthèse quantitative et qualitative des lignines dans ces plantes. Par conséquent, un dosage des lignines et une analyse de leurs compositions pourraient apporter de nombreuses informations sur cette voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et sur ses mécanismes de régulations. De récents travaux ont déjà mis en évidence une corrélation inverse existant entre ces composés au sein de plantes non modifiées génétiquement⁴².

⁴² R. Huis, K.Morreel, O.Fliniaux, A.Lucau-Danila, S.Fénart, S.Grec, G.Neutelings, B.Chabbert, F.Mesnard, W.Boerjan et S.Hawkins. «Natural Hypolignification Is Associated with Extensive Oligolignol Accumulation in Flax Stems.» *Plant Physiology* **158** (2012): 1-24.

Annexe



Functional Biotechnology

RNAi-mediated pinoresinol lariciresinol reductase gene silencing in flax (*Linum usitatissimum* L.) seed coat: Consequences on lignans and neolignans accumulation



Sullivan Renouard^{a,*}, Marie-Aude Tribalac^{c,1}, Frederic Lamblin^{a,1}, Gaëlle Mongelard^b, Ophélie Fliniaux^c, Cyrielle Corbin^a, Djurdjica Marosevic^a, Serge Pilard^d, Hervé Demailly^b, Laurent Gutierrez^b, Christophe Hano^a, François Mesnard^c, Eric Lainé^a

^a Laboratoire LBLGC EA 1207, Antenne Scientifique Universitaire de Chartres Univ Orleans, 21 rue de Loigny la Bataille, 28000 Chartres, France

^b CRRBM, Univ Picardie Jules Verne, 33 rue Saint-Leu, 80039 Amiens, France

^c Laboratoire BIOPI EA 3900, UFR de Pharmacie, 1 rue des Louvels 80037 Amiens, France

^d Plateforme analytique, UFR Sciences, 80039 Amiens, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 April 2014

Received in revised form 12 June 2014

Accepted 13 June 2014

Available online 23 June 2014

Keywords:

Flax

Lignans

RNA interference

Secoisolariciresinol

ABSTRACT

RNAi technology was applied to down regulate *LuPLR1* gene expression in flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. This gene encodes a pinoresinol lariciresinol reductase responsible for the synthesis of (+)-secoisolariciresinol diglucoside (SDG), the major lignan accumulated in the seed coat. If flax lignans biological properties and health benefits are well documented their roles *in planta* remain unclear. This loss of function strategy was developed to better understand the implication of the PLR1 enzyme in the lignan biosynthetic pathway and to provide new insights on the functions of these compounds. RNAi plants generated exhibited *LuPLR1* gene silencing as demonstrated by quantitative RT-PCR experiments and failed to accumulate SDG. The accumulation of pinoresinol the substrate of the PLR1 enzyme under its diglucosylated form (PDG) was increased in transgenic seeds but did not compensate the overall loss of SDG. The monolignol flux was also deviated through the synthesis of 8-5' linked neolignans dehydrodiconiferyl alcohol glucoside (DCG) and dihydro-dehydrodiconiferyl alcohol glucoside (DDCG) which were observed for the first time in flax seeds.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Lignans are monolignol dimers found in a number of plant families. They are present in various organs such as roots, rhizomes, nuts and seeds. The lignan secoisolariciresinol is peculiarly abundant in flax (*Linum usitatissimum*) seeds where it is mainly accumulated under its diglucosylated form (secoisolariciresinol diglucoside (SDG)). The biological activities and health benefits of flax lignans and their metabolites, enterodiol and enterolactone, have been extensively studied during the last ten years. The phytoestrogenic and antioxidant (Kitts et al., 1999) properties of flax lignans make them chemoprotective against the onset and development of hormone cancers and contribute to classify flax as a

functional food (reviewed by Westcott and Muir, 2003; Lainé et al., 2009).

SDG is synthesized from (–)-pinoresinol (resulting from the dimerisation of two coniferyl moieties) through the action of a pinoresinol lariciresinol reductase (PLR1). This bi-functional enzyme catalyzes first the reduction of (–)-pinoresinol into (–)-lariciresinol and then into (+)-secoisolariciresinol. The latter is the major enantiomer found in flax seed coats (Fig. 1) as evidenced by *in vitro* experiments using recombinant functional enzyme (Von Heimendahl et al., 2005; Hemmati et al., 2010).

Studies by Hano et al. (2006a) and Renouard et al. (2012) demonstrated that the transcriptional activity of the *LuPLR1* gene occurred in the flax seed coat all along its development and fitted well with the site of SDG accumulation.

Lignans present in the flax seed coat are accumulated under a macromolecular structure called the lignan oligomeric complex (Klosterman and Smith, 1954; Kamal-Eldin et al., 2001; Struijs et al., 2007). The backbone of this macromolecule is constituted by SDG, ester-linked to hydroxyl-methyl-glutaric acid (HMGA). Other

* Corresponding author. Tel.: +33 0237309753.

E-mail address: sullivan.renouard@univ-orleans.fr (S. Renouard).

¹ These authors contributed equally to the work.

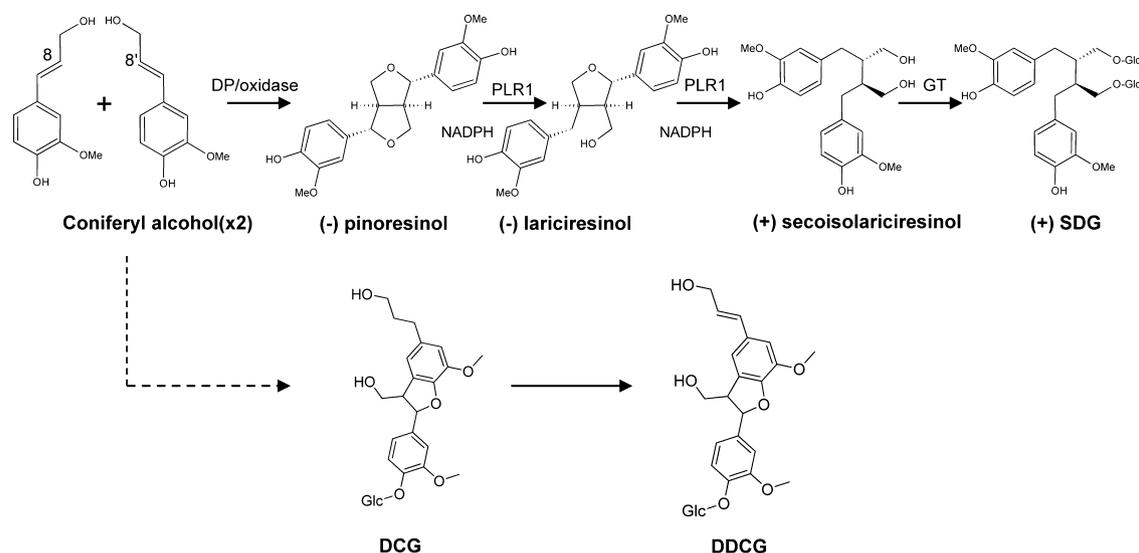


Fig. 1. Biosynthetic pathway leading to the formation of (+) secoisolariciresinol diglucoside (SDG) in flax seed coat (adapted from Ford et al., 2001) and the 8–5' linked neolignans dehydroconiferyl alcohol glucoside (a) and dihydro-dehydroconiferyl alcohol glucoside also derived from coniferyl alcohol found in cell suspensions cultures or in our RNAi transgenic seeds. DP/oxidase, dirigentprotein/oxidase complex; PLR1, pinoresinol lariciresinol reductase 1; SDG, secoisolariciresinol diglucoside; GT, glucosyl transferase.

phenolic compounds such as the flavonoid herbacetin diglucoside (HDG) (Struijs et al., 2007) and hydroxycinnamic acid glucosides (ester-linked to glucosyl moieties), ferulic acid (FeAG), and coumaric acid (CouAG) glucosides, have been also isolated from this oligomeric complex (Struijs et al., 2008).

The roles of lignans in planta remain mostly hypothetical despite biological activities have been demonstrated for some of them. Some effects against insects have been described (Harmatha and Nawrot, 2002; Harmatha and Dinan, 2003; Schroeder et al., 2006), thus suggesting an involvement in protection of the plant against herbivorous animals. But lignans could also play a role in protection against fungi or abiotic stress as suggested by the work of Esmailzadeh Babahadi et al. (2012) and Tahsili et al. (2014), who showed that adding fungal elicitor increased the *PLR* transcription in *Linum album* cell culture. The work of Corbin et al. (2013) who demonstrated a regulation of the transcription of the *LuPLR1* gene in flax by ABA also suggests an involvement of lignans in a response to a stress. Nevertheless, evidence is still lacking that these roles do exist *in planta*, this as long as no plant without the corresponding lignan is available to allow comparison. For flax there is neither available cultivar nor mutant devoid of lignan, therefore knocking down the production of the enzymes involved in lignan synthesis is the sole tool to allow a comparison between plants “with” and “without” the main flax lignan, SDG.

RNA interference strategy using hairpin dsRNA has proved to be a powerful tool to study the function of genes in planta as well as for genetic engineering of plant metabolism (Helliwell and Waterhouse, 2003; McGinnis, 2010; Roach et al., 2011). Hemmati et al. (2007) successfully used the RNA interference to knock down the *PLR-Lp1* gene of *Linum perenne*, encoding a pinoresinol lariciresinol reductase, in hairy root lines. As a consequence, the major lignan justicidin B accumulation was reduced down to 24% compared to control root lines, confirming the involvement of PLR-Lp1 in the biosynthesis of this lignan of interest. Similar experiments were conducted by Bayindir et al. (2008) who down-regulated the *PLR-Lc1* gene of *Linum corymbulosum*. The accumulation of the lignan hinokinin was nearly suppressed in the *PLR-Lc1* down-regulated hairy root lines. With the aim of modifying the lignan profile in *Forsythia* cell suspensions by genetic engineering Kim et al. (2009) combined RNAi-mediated down regulation of the *PLR* gene and overexpression of piperitol-sesamin synthase encoding gene. The

resulting transgenic cell lines produced pinoresinol glucoside and sesamin, a valuable compound, whereas control lines only accumulated pinoresinol and matairesinol glucosides.

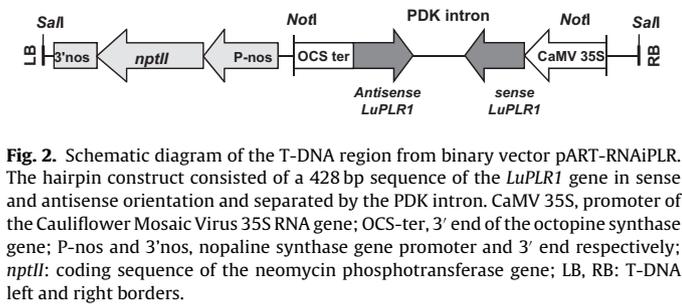
Nevertheless, this kind of work has not been done so far to produce whole plants able to set seeds with reduced lignan content. Such RNAi plants would provide a valuable tool to assess the role of lignan *in planta*, providing the “minus lignan” element that will be compared with wild type plants for the putative defense capacity conferred by lignans accumulated in the seedcoat. The availability of *LuPLR1* cDNA sequence allowed its use in constructs designed to inhibit the synthesis of SDG by RNA interference.

In the present work the RNAi strategy was developed to knock down the *LuPLR1* gene in flax with the aim of better understanding the implication of this enzyme in the lignan biosynthetic pathway, and to further provide new insights on the functions of these compounds in flax.

Materials and methods

Binary vector construction

A 428 bp fragment of the *LuPLR* coding sequence (from bp +387 to +810) was amplified by PCR using the following specific primers extended with two sets of restriction sites for further sense or antisense cloning into the pHan-nibal vector (Wesley et al., 2001): *LuPLR-Fow* (*Xba*I, *Xho*I) 5'-GATTCTAGACTCGAGGAGGAGACGTTTCGATCTG-3', *PLR-R1 Rev* (*Cl*aI, *Kpn*I) 5'-GATATCGATGGTACCGTAGAGGTGCCCTATTACG-3'. The amplification product excluded the conserved sequence “GxxGxxG” of the NADPH binding domain to avoid down-regulation of other NADPH-dependent reductases. The expression cassette containing the sense and antisense *LuPLR* fragments (separated by the *Pdk* intron) under the control of the 35S CaMV promoter was then ligated into the *Not*I digested pART27 binary vector. The pART27 T-DNA carried the *nptII* gene under the control of the nopaline synthase gene promoter as selection marker. The resulting pART-RNAiPLR vector (T-DNA scheme, Fig. 2) was further mobilized into the disarmed *Agrobacterium tumefaciens* strain GV301 (pGV2260) by triparental mating.



Flax transformation procedure

The transformation protocol described by Mlynarova et al. (1994) was used with few modifications (Lacoux et al., 2003). Hypocotyl segments (1 cm) from 5-day-old seedlings were immersed for 2 h in the bacterial culture, then blotted dry on sterile filter paper and co-cultivated for 2 days on solid MSD4X2 regeneration medium (2.8 g L⁻¹ Phytigel as gelling agent). After three washes (5 min) in a 1 g L⁻¹ Timentin (Duchefa, Haarlem, Netherlands) solution, hypocotyls were placed on MSD4X2 selective medium containing 300 mg L⁻¹ kanamycin and 500 mg L⁻¹ Timentin to eliminate bacteria. After 2 weeks, calli growing at the cut ends of hypocotyls were sectioned and subcultured every 2 weeks on MSD4X2 selective medium (300 mg L⁻¹ kanamycin and 500 mg L⁻¹ Timentin). Bud formation occurred on some of the hypocotyl-derived calli cultivated on kanamycin-containing medium. Green buds were then isolated and grown onto E0 selective medium (MS0 supplemented with 3.5 mM MES, 100 mg L⁻¹ Km, 250 mg L⁻¹ Timentin and 8 g L⁻¹ agar, pH 5.7). Rooting occurred on RoA medium (Half strength Murashige and Skoog (1962) macronutrients and micronutrients, Morel and Wetmore (1951) vitamins, 12.5 g L⁻¹ Sucrose, 3.5 mM MES, 100 mg L⁻¹ Km, 250 mg L⁻¹ Timentin and 8 g L⁻¹ agar, pH 5.6).

Kanamycin-resistant plantlets (primary transformants R0 generation) were micropropagated then transferred in soil and acclimatized in the greenhouse (day 22–24 °C, night 18–20 °C; 30–55% relative humidity; the natural photoperiod was supplemented with 14 h illumination from Philips Sun-T Agro 400 Na lights). Three of the R0 individuals (Pi1Y, Pi1AM, Pi1AJ) were randomly chosen to produce progeny (R1 individuals). Progeny were grown in the greenhouse under the same conditions. Each R1 individual was screened by PCR for the presence of the *nptII* selectable marker gene.

Three *nptII* positive individuals were randomly chosen from each independent progeny (Pi1Y R1, Pi1AM R1 and Pi1AJ R1 individuals) and subjected to RNA extraction from stage 2–3 (Fig. 3) immature seeds and gene expression study by quantitative RT-PCR. The composition of the lignan oligomeric complex in stage 5 mature seeds before dessication (Fig. 3) was estimated for five or six R1 individuals from the three independent progenies.

PCR analysis of transgenic plantlets

Genomic DNA was extracted from young leaves (150 mg fresh weight) of plantlets, which had been growing for at least 3 months on selective medium, according to a method described by Doyle and Doyle (1990). PCR experiments on genomic DNA were performed by using P2, 5'-ATCGGGAGCGGGATACCGTA-3' (position 201) as 5' primer and P1, 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' (position 900) as 3' primer, designed for the amplification of a 0.7-kb DNA fragment of the *nptII* coding sequence. Reactions were carried out in a total volume of 50 µl containing 200 µM of each dNTP, 1 µM of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 0.25 µg of genomic DNA, 0.5 units Taq DNA polymerase (Promega) and PCR buffer. Samples were subjected to

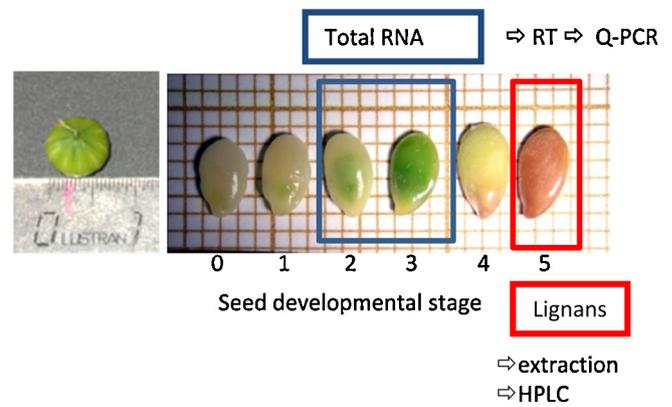


Fig. 3. Procedure of harvesting for further molecular and phytochemical analysis. Immature green seeds (stages 2 and 3) were harvested after dissection of seed bolls and used for further RNA extraction and Q-RT-PCR analysis. Mature seeds were used for the extraction and HPLC quantification of lignans and other phenolic compounds.

35 cycles of 1 min denaturation at 94 °C, 1 min annealing at 55 °C and 1 min extension at 72 °C. Amplified DNA fragments were visualized under ultraviolet light after electrophoresis on 1.0% agarose gels containing TAE running buffer and ethidium bromide.

RNA isolation and cDNA synthesis

RNAs from seeds (stages 2 and 3) of flax transgenic lines and wild-type controls were prepared as described in Renouard et al. (2012). Portions (5 µg) of the resulting RNA preparations were treated with DNaseI using a DNAfree Kit (Ambion) and cDNA was synthesized by reverse-transcribing 5 µg of total RNA using M-MuLV reverse transcriptase (Thermo Scientific Fermentas) with 500 ng of oligo(dT)₁₂ primer according to the manufacturer's instructions. The reaction was stopped by incubation at 70 °C for 10 min, the reaction mixture was then treated with RNaseH (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and diluted by adding 500 µL of dH₂O. All cDNA samples were tested by PCR using specific primers flanking an intron sequence to confirm the absence of genomic DNA contamination.

Real-time RT-PCR experiments and data analysis

Transcript levels were assessed by quantitative RT-PCR, in assays with triplicate reaction mixtures (final volume, 10 µL) containing 2 µL of cDNA, 0.5 µM of both forward and reverse primers and 1 × LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche) in 384-well plates. The plates were filled by an EVO150 robotic liquid handling platform (Tecan) and quantitative PCR was performed in a LightCycler[®] 480 (Roche). The CT values for each sample were acquired with the LightCycler[®] 480 software (Roche), using the second derivative maximum method. The following standard protocol was applied for the amplification of each mRNA: 5 min at 95 °C, followed by 45 cycles of 10 s at 95 °C, 10 s at 60 °C, and 10 s at 72 °C. A melting curve analysis was added to the PCR program in order to check that the fluorescence signal was derived from the single intended amplicon in all the runs. The primers used for the target gene were LuPLR1-F (5'-TATGGAGATGGCAACGTCAA-3') and LuPLR1-R (5'-TTGGTTCCTGAGAGCTTTT-3'). To normalize the real-time RT-PCR data, *c3168* and *c10916* genes, previously validated as the most stably expressed genes among 12 tested during flax seed development (Fenart et al., 2010), were used. The normalized expression patterns obtained using both reference genes were similar, so only the data normalized with *c10916* are shown. The expression in wild-type controls and in transgenic lines was calculated using the formula $E_R^{CR} / E_T^{CT} / E_T^{WT}$ [i.e. $(1/E_T^{CT} / E_T^{WT}) / (1/E_R^{CR} / E_R^{WT})$].

the normalized relative quantity of template in the original sample], the expression levels of target genes being relative to those of the reference gene. The relative transcript amount was calculated as the mean of three technical replicates, using the method for calculation of standard errors in relative quantification recommended by Rieu and Powers (2009).

Metabolite extraction

100 mg of flax seed were mechanically grinded, using a MM 400 RETSCH grinder, 20 min at 100 Hz. Then powder was incubated 30 min at 60 °C in 0.1 N NaOH methanol 50% solution. After neutralization with HCl samples were centrifuged 15 min at 4000 rpm, at 4 °C. HPLC analyses were done on filtered supernatants.

HPLC analysis

The determination of PDG, SDG, dehydrodiconiferyl alcohol glucoside (DCG) and dihydro-dehydrodiconiferyl alcohol glucoside (DDCG) was carried out on a Dionex Ultimate 3000 system including a DGP 3600 BM pump, a column oven TCC 3x00, a WPS-3000 autosampler, and a Dyonex 3000 Photodiode array detector (PAD). The separation was performed at 35 °C. The column used was a C18-alkyle amide Supelco® ABZ+ Plus (5 µm, 250 × 4.6 mm) with a precolumn C18 (Waters, µbondapack, 10 µm). The mobile phase consisted of 0.2% acetic acid in water (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The composition of the mobile phase varied during runs according to a nonlinear gradient at a flow rate of 0.8 mL/min as follows: from 0 to 20 min of A/B, 100:0 (v/v) to 82:18 (v/v); from 20 to 35 min of A/B, 82:18 (v/v) to 82:18 (v/v), from 35 to 70 min of A/B, 82:18 (v/v) to 0:100 (v/v) and from 70 to 90 min of A/B, 0:100 (v/v) to 0:100. Detection was performed at 280 nm. PDG, SDG, DCG and DDCG were initially identified by comparison of their retention times and their mass spectrometry assignment. Quantification was performed using calibration curves of PDG and SDG standard.

Statistical treatment of data

All data presented in this study are the mean and standard deviation of (at least) three independent replicates. Comparative statistical analysis of groups was performed using Student test. Statistical tests were considered to be significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

RNAi plants looked and grew like the control plants, thus confirming that the lignans play probably a role in plant defense rather than in the essential metabolism, nevertheless the role of the compounds which synthesis was affected may have been taken by newly synthesized molecules (see further). The aspect of the seeds remained also unchanged despite the change in the lignan content. It is not surprising that the seedcoat color was not affected as no correlation was observed when color intensity and secoisolariciresinol quantity were studied in seeds of a wide range of flax cultivars (unpublished data).

LuPLR1 transcript level was strongly reduced in the seeds of PLR-RNAi plants

The presence of the *nptII* gene was detected in most of the R1 individuals that were analyzed (Pi1Y R1 33 out of 40, Pi1AM R1 10 out of 13, Pi1AJ R1 19 out of 19, data not shown). Fig. 4 shows the PCR results for the 17 R1 individuals selected for the study. The signal, corresponding to a 0.7 kb fragment of the selectable marker gene, confirmed their transgenic state.

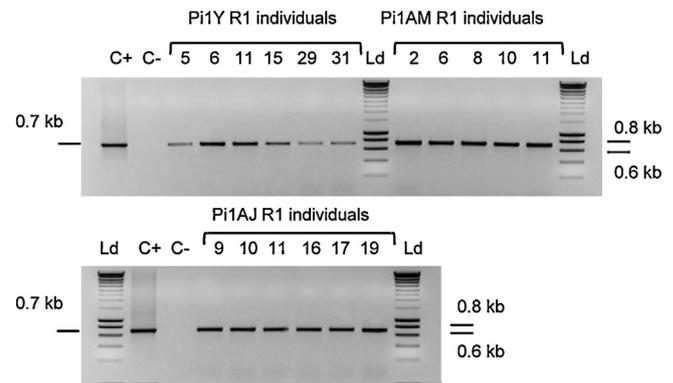


Fig. 4. Amplification of *nptII* sequence from genomic DNA of kanamycin-resistant R1 plants transformed with pART-RNAiPLR binary vector. PCR products obtained with a specific set of primers designed for the amplification of a 0.7 kb *nptII* fragment were separated by 1.0% agarose gel electrophoresis and visualized with ethidium bromide. Ld, Smart ladder (Eurogentec); C+, *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 (pGV2260/pART-RNAiPLR) as positive control; C-, untransformed plantlet as negative control; Pi1Y R1, Pi1AM R1 and Pi1AJ R1 individuals correspond to the progenies of three independent primary transformants.

A significant reduction of the steady state level of *LuPLR1* mRNA was observed in the seeds from all transgenic lines (Fig. 5). When compared to the wild-type control, a 15–25-fold decrease in mRNA level could be observed depending on the transgenic line.

LuPLR1 gene drives SDG biosynthesis in flax seeds

In order to assess the impact of *LuPLR1* gene expression defect on lignan biosynthesis in flax seed, lignan and neo lignan contents were estimated in mature seeds (stage 5), by HPLC analysis of methanolic extracts that had been subjected to alkaline hydrolysis. Wild-type control plants displayed a mean SDG yield of 19.98 mg g⁻¹ dry seed (Fig. 6a), which is in agreement with the previous results obtained by Hano et al. (2006a) and Renouard et al. (2010, 2012) on the same cultivar. In addition, a mean pinoresinol diglucoside yield of 0.353 mg g⁻¹ dry seed could be detected (Fig. 6b). Interestingly, in transgenic seeds a dramatic decrease in SDG was observed together with a significant increase in the accumulation of PDG, the SDG pinoresinol precursor in its diglucosylated form (Fig. 6a and b). A 30–50-fold decrease in SDG yield was measured in the transgenic lines when compared to the mean control. The minute amounts of SDG are consistent with the fact that, while strongly reduced, a very low residual expression of *LuPLR1* was found by quantitative RT-PCR in the transgenic lines

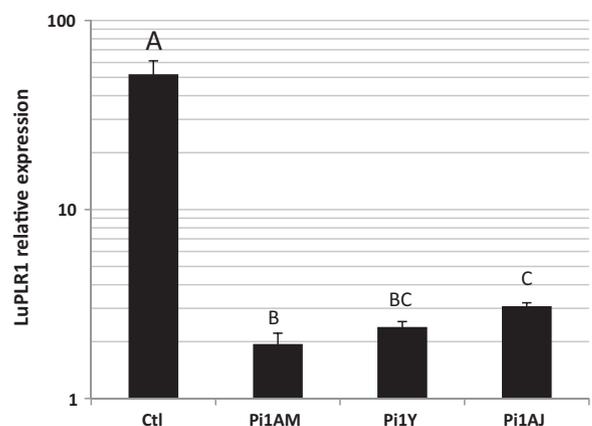


Fig. 5. Relative expression levels of gene encoding PLR1 in stages 2–3 immature seeds estimated by quantitative RT-PCR. Reference gene. Bars = SD. Different letters indicate significant differences.

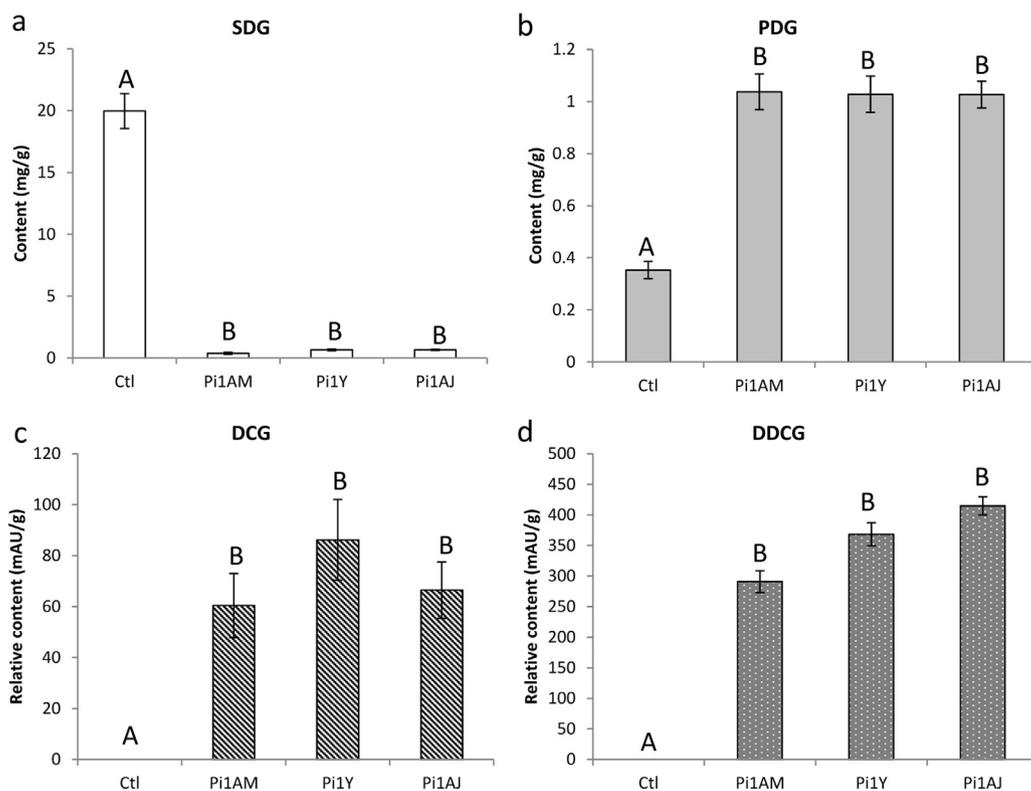


Fig. 6. Lignan contents in mature seeds. Pi1AM R1, Pi1Y and Pi1AJ R1 correspond to the progenies of three independent primary transformants. SDG (a) and PDG (pinoresinol diglucoside) (b), yields are expressed as mg g^{-1} seed (dry weight). DCG (dehydrodiconiferyl alcohol glucoside) (c) and DDCG (dihydro-dehydrodiconiferyl alcohol glucoside) (d) yields are expressed as mAU g^{-1} seed (dry weight). Means value of five untransformed control individuals and six individuals for transgenics. Bars = SD. Different letters indicate significant differences.

(Fig. 5). However, the PDG yield observed in the transgenic lines was only ~ 3 -fold increased compared to the wild-type control. This increase in the accumulation of the LuPLR1 substrate in the seed does not compensate the dramatic loss of SDG. If a simple compensation had occurred, the PDG content should have reached $15\text{--}20 \text{ mg g}^{-1}$ dry seed, whereas levels measured in transgenic lines were in fact only around 1 mg g^{-1} . The present results suggest that most of the coniferyl alcohol may have not been converted into pinoresinol in the transgenic lines analyzed. Pinoresinol might also have been incorporated into another macromolecule such as the cell wall polymer lignin, or metabolized into another compound. There might be a feed-back inhibition of the dimerization process that yield lignans and that, as a consequence, neolignans are synthesized. No lariciresinol, the intermediate product of the LuPLR1 enzyme, could be detected in the extracts of the transgenic down regulated lines.

These results evidence for the first time the direct *in vivo* implication of the *LuPLR1* gene in the biosynthesis of (+)SDG, the major lignan accumulated in the flax seed coat. Similar observations in organ culture systems of *Linum perenne* were previously made by Hemmati et al. (2007) who demonstrated that RNAi-mediated down regulation of *PLR-Lp1* gene hairy roots led to almost 75% decrease in justicidin B accumulation, a lignan with a number of health protecting biological activities. The *in vivo* involvement of *PLR-Lc1* gene in the biosynthesis of hinokinin in *Linum corymbulosum* was evidenced using the same approach (hairy root lines). In that case, no more hinokinin could be detected in the *PLR-Lc1* knocked-down root lines (Bayindir et al., 2008). Kim et al. (2009) used a RNAi strategy for the metabolic engineering of lignan biosynthesis in a *Forsythia* cell suspension culture. With the aim of increasing the pinoresinol content they down-regulated the *PLR* gene. As a result, matairesinol accumulation was nearly suppressed and in

counterpart a 20-fold increase in pinoresinol-diglucoside was observed. The overexpression of a piperitol sesamine synthase gene in such a *PLR* down-regulated cell line led to the accumulation of sesamin as a new compound.

Disruption of lignan synthesis in the seed leads to synthesis of new compounds

The presence of 8–5' linked neolignans DCG and DDCG (Fig. 1) was detected in transgenic lines (Fig. 6c and d). These compounds were not found in the control wild type seeds. Their presence in flax seeds is reported here for the first time. DCG had already been detected in flax cell suspensions as the major coniferyl alcohol-derived compound (Attoumbré et al., 2006; Hano et al., 2006b; Beejmohun et al., 2007). These results suggest the metabolization of monolignols in *LuPLR1* down-regulated seeds for the synthesis of new compounds. DCG and DDCG formation could result from the dimerisation of two coniferyl alcohol moieties without intervention of a dirigent protein, this as a consequence of excessive quantity of monolignols or dirigent protein retroinhibition as a result of the pinoresinol product accumulation driven by the *PLR* synthesis inhibition.

Flaxseeds are not prone to destruction by a number of insects contrary to their fabaceae or poaceae counterparts, this could be a clue of the presence of toxic, antifeedant or repellent properties of the compound contained in the flaxseed. But flaxseed contains molecules already identified as toxic for herbivorous insects (weevils) such as the cyanogenic linamarin and linustatin. It is difficult to attribute this trait to one or another compound without availability of seeds devoid of one of the molecules. Further experiments using the generated transgenic lines devoid of SDG will be performed in order to compare their behavior in the domain of insect resistance.

Oil protection and other parameters such as germination timing or efficiency will also deserve study using these transgenic lines lacking SDG.

Acknowledgements

Sullivan Renouard obtained a grant from the French Ministry of Research and Technology. The authors wish to thank the “Conseil Général d'Eure et Loir” and the “Ligue Contre le Cancer, Comité d'Eure et Loir” for the financial support of this program.

References

- Attoumbré J, Hano C, Mesnard F, Lamblin F, Bensaddek L, Raynaud-Le Grandic S, et al. Identification by NMR and accumulation of a neolignan, the dehydroconiferyl alcohol-4- β -D-glucoside, in *Linum usitatissimum* cell cultures. *Comptes Rendus Chimie* 2006;9:420–5.
- Bayindir U, Alfermann AW, Fuss E. Hinokinin biosynthesis in *Linum corymbulosum* Reichenb. *Plant J* 2008;55:810–20.
- Bejmohun V, Fliniaux O, Hano C, Pilard S, Grand E, Lesur D, et al. Coniferin dimerisation in lignan biosynthesis in flax cells. *Phytochemistry* 2007;68:2744–52 [PSE50 special issue].
- Corbin C, Renouard C, Lopez C, Lamblin C, Lainé E, Hano C. Identification and characterization of cis-1 acting elements involved in the regulation of ABA- and/or GA-mediated LuPLR1 gene expression and lignan biosynthesis in flax (*Linum usitatissimum* L.) cell cultures. *J Plant Physiol* 2013;170:516–22.
- Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *BRL Focus* 1990;12:13–5.
- Esmailzadeh Babahadi S, Sharifa M, Behmanesh M, Safaie N, Muratad J, Arakid R, et al. Time-course changes in fungal elicitor-induced lignan synthesis and expression of the relevant genes in cell cultures of *Linum album*. *J Plant Physiol* 2012;169:487–91.
- Fenart S, Ndong YP, Duarte J, Rivière N, Wilmer J, van Wuytswinkel O, et al. Development and validation of a flax (*Linum usitatissimum* L.) gene expression oligo microarray. *BMC Genom* 2010;11:592–605.
- Ford JD, Huang KS, Wang HB, Lewis NG. Biosynthetic pathway to the cancer chemopreventive secoisolaricresinol diglucoside-hydroxymethyl glutaryl ester-linked lignan oligomers in flax (*Linum usitatissimum*) seed. *J Nat Prod* 2001;64:1388–97.
- Hano C, Martin I, Fliniaux O, Legrand B, Gutierrez L, Arroo RR, et al. Pinoresinol-laricresinol reductase gene expression and secoisolaricresinol diglucoside accumulation in developing flax (*Linum usitatissimum*) seeds. *Planta* 2006a;224:1291–301.
- Hano C, Addi M, Bensaddek L, Crônier D, Baltora-Rosset S, Doussot J, et al. Differential accumulation of monolignol-derived compounds in elicited flax (*Linum usitatissimum*) cell suspension cultures. *Planta* 2006b;223:975–89.
- Harmatha J, Dinan L. Biological activities of lignans and stilbenoids associated with plant–insect chemical interactions. *Phytochem Rev* 2003;2:321–30.
- Harmatha J, Nawrot J. Insect feeding deterrent activity of lignans and related phenylpropanoids with a methylenedioxyphenyl (piperonyl) structure moiety. *Entomol Exp Appl* 2002;104:51–60.
- Helliwell C, Waterhouse P. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods* 2003;30:289–95.
- Hemmati S, Schmidt TJ, Fuss E. (+)-Pinoresinol/(–)-laricresinol reductase from *Linum perenne* Himmelszelt involved in the biosynthesis of justicidin B. *FEBS Lett* 2007;581:603–10.
- Hemmati S, von Heimendahl CB, Klaes M, Alfermann AW, Schmidt TJ, Fuss E. Pinoresinol-laricresinol reductases with opposite enantiospecificity determine the enantiomeric composition of lignans in the different organs of *Linum usitatissimum* L. *Planta Med* 2010;76:928–34.
- Kamal-Eldin A, Peerlkamp N, Johnsson P, Andersson R, Andersson RE, Lundgren LN, et al. An oligomer from flaxseed composed of secoisolaricresinoldiglucoside and 3-hydroxy-3-methyl glutaric acid residues. *Phytochemistry* 2001;58:587–90.
- Kim HJ, Ono E, Morimoto K, Yamagaki T, Okazawa A, Kobayashi A, et al. Metabolic engineering of lignan biosynthesis in *Forsythia* cell culture. *Plant Cell Physiol* 2009;50:2200–9.
- Kitts DD, Yaun YU, Wijewickreme AN, Thompson LU. Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolaricresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Mol Cell Biochem* 1999;202:91–100.
- Klosterman HJ, Smith F. The isolation of β -hydroxy- β -methylglutamic acid from the seed of flax (*Linum usitatissimum*). *J Am Chem Soc* 1954;76:1229–30.
- Lacoux J, Klein D, Démon JM, Dauchel H, Lamblin F, Alexandre F, et al. Study of a pectin methyltransferase using transgenesis with antisense construct and promoter-reporter fusion. In: Visser R, editor. *Pectins and pectinases*. Dordrecht: Kluwer; 2003. p. 183–200.
- Lainé E, Hano C, Lignans LF, Knasmüller S, DeMarini DM, Johnson I, Gerhäuser C, editors. *Chemoprevention of cancer and DNA damage by dietary factors*. Weinheim: Wiley-VCH; 2009. p. 555–68.
- McGinnis K. RNAi for functional genomics in plants. *Brief Funct Genom* 2010;9:111–7.
- Mlynarova L, Bauer M, Nap JP, Pretova A. High efficiency *Agrobacterium*-mediated gene transfer to flax. *Plant Cell Rep* 1994;13:282–5.
- Roach MJ, Mokshina NY, Badhan A, Snegireva AV, Hobson N, Deyholos MK, Gorskova TA. Development of cellulose secondary walls in flax fibers requires β -galactosidase. *Plant Physiol* 2011;156:1351–63.
- Morel G, Wetmore RM. Fern callus tissue culture. *Am J Bot* 1951;38:141–3.
- Murashige T, Skoog FA. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962;15:473–97.
- Renouard S, Hano C, Corbin C, Fliniaux O, Lopez T, Montguillon J, et al. Cellulase-assisted release of secoisolaricresinol from extracts of flax (*Linum usitatissimum*) hulls and whole seeds. *Food Chem* 2010;122:679–87.
- Renouard S, Corbin C, Lopez T, Montguillon J, Gutierrez L, Lamblin F, et al. Abscisic acid regulates pinoresinol-laricresinol reductase gene expression and secoisolaricresinol accumulation in developing flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Planta* 2012;235:85–98.
- Rieu I, Powers SJ. Real-time quantitative RT-PCR: design, calculations, and statistics. *Plant Cell* 2009;21:1031–3.
- Schroeder FC, del Campo ML, Grant JB, Weibel DB, Smedley SR, Bolton KL, Jerrold Meinwald J, Eisner T. Pinoresinol: a lignol of plant origin serving for defense in a caterpillar. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:15497–501.
- Struijs K, Vincken JP, Verhoef R, van Oostveen-van Casteren WH, Voragen AG, Gruppen H. The flavonoid herbacetin diglucoside as a constituent of the lignan macromolecule from flaxseed hulls. *Phytochemistry* 2007;68:1227–35.
- Struijs K, Vincken JP, Verhoef R, Voragen AG, Gruppen H. Hydroxycinnamic acids are ester-linked directly to glucosyl moieties within the lignan macromolecule from flaxseed hulls. *Phytochemistry* 2008;69:1250–60.
- Tahsili J, Sharifi M, Safaie N, Esmailzadeh-Babahadi S, Behmanesh M. Induction of lignans and phenolic compounds in cell culture of *Linum album* by culture filtrate of *Fusarium graminearum*. *J Plant Interact* 2014;9:412–7.
- Von Heimendahl CB, Schäfer KM, Eklund P, Sjöholm R, Schmidt TJ, Fuss E. Pinoresinol-laricresinol reductases with different stereospecificity from *Linum album* and *Linum usitatissimum*. *Phytochemistry* 2005;66:1254–63.
- Westcott ND, Muir AD. Flax seed lignans in disease prevention and health promotion. *Phytochem Rev* 2003;2:401–17.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 2001;27:581–90.

Marie-Aude Tribalat

Etude métabolomique de lin (*Linum usitatissimum*) mutant pour la voie de biosynthèse des lignanes

Thèse pour le diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne, 2016

RESUME

Les phénylpropanoïdes sont des métabolites secondaires accumulés dans de nombreuses espèces végétales. La voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes aboutit notamment à la formation des lignines, ainsi que des lignanes et des flavonoïdes. Chez le lin (*Linum usitatissimum*), espèce agronomique d'intérêt régional, ces derniers composés sont accumulés en quantité importante dans la graine. Un intérêt particulier est porté à ces composés pour les propriétés biologiques qu'ils présentent en termes de santé humaine et de nutrition. Cependant leur rôle *in planta* n'est actuellement pas clairement défini. Les connaissances acquises sur la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et des lignanes permettent de produire des plantes transgéniques inhibant ou surexprimant certains gènes d'intérêt dans le but de comprendre les mécanismes de régulation de ces voies ainsi que leur impact sur l'ensemble de la plante.

Le travail présenté porte sur l'étude métabolomique par RMN ¹H de graines issues de plantes transgéniques : certaines surexprimant le gène codant pour la férulate-5-hydroxylase, d'autres inhibant le gène codant pour la pinorésinol-laricirésinol-réductase. Dans les deux cas, une diminution de la biosynthèse du sécoisolaricirésinol diglucoside (SDG), principal lignane accumulé dans la graine de lin, est observée. Un impact sur l'ensemble du métabolome est également observé. Ces résultats permettent de poser différentes hypothèses quant aux mécanismes de régulation de ces voies ainsi que sur le rôle des lignanes dans la plante.

Mots clés : *Linum usitatissimum*, lignanes, voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, métabolomique, RMN

Metabolomic study of flax (*Linum usitatissimum*) mutant for lignans biosynthesis pathway

ABSTRACT

Phenylpropanoids are secondary metabolites that are present in many plant species, and their biosynthesis pathway leads to lignin, lignans and flavonoids production. Phenylpropanoids are of particular interest because of their biological properties in human health and nutrition. These compounds are found, in particular, in large quantities in the seed of flax (*Linum usitatissimum*) which is an important agricultural species, however, their *in planta* function is still unknown. Knowledge on phenylpropanoids, and more precisely, lignan pathway provides opportunities to produce plants by inhibiting or overexpressing some genes of interest, resulting in a better understanding of the pathway regulation mechanism and their impact on general plant physiology.

This research employs NMR ¹H to study the metabolism of phenylpropanoids in flax seed obtained from transgenic plants that were generated by overexpressing ferulate-5-hydroxylase or by inhibiting pinoresinol lariciresinol reductase genes. The result of the study showed that both transgenic plants contained lower amount of secoisolariciresinol diglucoside which is the main lignan found in flax seed. The results also indicated an impact on the general metabolism in the plant. These findings help to propose some hypothesis to explain phenylpropanoid pathway and function of lignan in plants.

Key words: *Linum usitatissimum*, lignans, phenylpropanoid biosynthesis pathway, metabolomic, NMR