

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Discipline: Biologie

Présentée par

Taissir El GUIZANI

***Identification et Caractérisation des Orthologues du
Transporteur ABC humain ABCC10
chez Catharanthus roseus et Arabidopsis thaliana.***

Directeur de thèse : Benoit ST-PPIERRE & Saïda TRIKI

Jury composé de

Aly Raies: Président

Eric Ducos: Co-directeur de thèse

Marc Boutry: Rapporteur

Kamel Ben Mahrez: Rapporteur

Saïda Triki: Directeur de thèse

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. Les différents types de transports	6
2. Les transporteurs ABC : définitions et généralités	11
3. Organisation en domaines des transporteurs ABC	13
3.1. Les domaines NBD : Domaines de liaison des nucléotides	13
3.1.1. Structure des domaines de liaison des nucléotides (NBD)	15
3.1.2. Interactions entre les domaines NBD	17
3.2. Les domaines TMD : Domaines transmembranaires	18
3.2.1. Rôle des domaines transmembranaires (TMD)	19
3.3. Autres domaines	20
4. Organisation modulaire et sous-familles de protéines ABC	23
5. Mécanisme du transport	27
6. Quelques pathologies associées au dysfonctionnement des protéines ABC	29
7. Les transporteurs ABC chez les bactéries	29
8. Les transporteurs ABC humains	31
9. Les transporteurs ABC chez les plantes	35
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES	41
I. Matériels utilisé pour l'expérimentation	42
1. Les graines de <i>Catharanthus roseus</i>	42
2. La lignée cellulaire C20D de <i>Catharanthus roseus</i>	42
3. Obtention des germinations de <i>Catharanthus roseus</i>	43
4. Obtention des plants d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
II. Méthodes	43
1. Méthodes de microbiologie	43
1.1. Milieux de culture et antibiotiques	43
1.1.1. Milieu LB Hight salt pour <i>Escherichia coli</i>	43
1.1.2. Milieu 2YT pour <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	44
1.2. Préparation des bactéries (<i>E. coli</i>)	44
1.2.1. Préparation des bactéries <i>E. coli</i> électro-compétentes	44
1.2.2. Préparation des bactéries (<i>E. coli</i>) thermocompétentes : Top 10F'	45
1.3. Extraction d'ADN plasmidique à partir des cultures <i>E. coli</i>	45
1.3.1. Mini-préparation d'ADN plasmidique au TENS	45
1.3.2. Utilisation d'un kit commercial	46
1.4. PCR directe sur colonie bactérienne	47
2. Méthodes de biologie Moléculaire	47
2.1. Méthodes d'extraction des acides nucléiques de plantes	47
2.1.1. Extraction d'ADN génomique (ADNg) de <i>C. roseus</i>	47
2.1.2. Préparation d'ARN de plante : kit commercial (Qiagen)	48
2.1.3. Extraction d'ADN génomique par CTAB	48
2.2. Electrophorèse des acides nucléiques	49

2.2.1.	Electrophorèse en gel d'agarose TAE	49
2.2.2.	Purification de fragment d'ADN d'un gel d'agarose électrophorétique TAE	49
2.3.	La réaction de polymérisation en chaîne : PCR (Polymerase Chain Reaction)	50
2.3.1.	Principe de la réaction en chaîne de polymérase (PCR)	50
2.3.2.	Procédure expérimentale de la PCR	51
2.3.3.	PCR emboîtée (nested-PCR)	52
2.3.4.	PCR semi-quantitative	52
2.4.	Modification et analyse des acides nucléiques	53
2.4.1.	Digestion par les enzymes de restriction.	53
2.4.2.	Rétro-transcription d'ARN en ADN complémentaire (ADNc)	53
2.4.3.	Transfert d'une queue dCTP sur l'extrémité 3' des ADNc	54
2.4.4.	Addition d'une désoxyadénosine aux extrémités 3' des produits PCR	55
2.5.	Clonage	55
2.5.1.	Préparations des plasmides : TA-cloning	55
2.5.2.	Insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur : étape de ligation	56
2.5.3.	Transformation bactérienne	56
2.5.4.	Purification de l'ADN plasmidique	56
2.6.	Séquençage d'ADN et analyse de séquences nucléotidiques	56
2.7.	Déphosphorylation d'un plasmide	57
2.8.	Les vecteurs de clonage	58
2.8.1.	Description du vecteur pGEM®-T Easy	58
2.8.2.	Description du vecteur pSCA-cYFP	58
2.9.	Méthodes spécifiques à l'obtention de la séquence complète de CrABCC1	60
2.9.1.	Séquences de CrABCC1 initialement obtenues	60
2.9.2.	Amplification de l'extrémité 5' de CrABCC1 : Utilisation d'ADNc-tailé	60
3.	Méthode de biologie cellulaire	61
3.1.	Expression génique transitoire	61
3.1.1.	Co-culture Agrobacterium / cellules C. roseus C20D	61
3.1.2.	Infiltration en feuilles de tabac ou C. roseus	62
3.1.3.	Par biolistique	63
3.1.4.	Par transfection des protoplastes	64
3.2.	La méthode de Dipping florale	67
3.3.	Observation au microscope à épifluorescence	68
4.	Les traitements hormonaux et nutritionnels	69
5.	Localisation histochimique de l'activité GUS	70
6.	Dosage fluorimétrique	70
7.	Etablissement de lignées knock-out homozygotes pour AtABCC13	71
8.	Analyses phylogénétiques et topologiques	71
CHAPITRE III. RESULTATS ET DISCUSSIONS		73
Etude du transporteur CrABCC1		74
I. Etude du transporteur CrABCC1 de Catharanthus roseus		75
1.	Généralité sur la plante modèle : Catharanthus roseus	75
1.1.	Catharanthus roseus : plante médicinale	75
1.2.	Catharanthus roseus : source d'alcaloïdes anticancéreux	75
1.3.	Catharanthus roseus : Voie de biosynthèse des Alcaloïdes Indoliques Monoterpéniques	77
1.4.	Compartimentation cellulaire et subcellulaire de la biosynthèse des AIM	80

2.	Rappel et complément sur les transporteurs ABCC	82
3.	Résultats et discussions	83
3.1.	Obtention des ESTs de <i>C. roseus</i> et analyse phylogénétique	83
3.2.	Orthologie entre CrABCC1 de <i>C. roseus</i> et ABCC10 humain	87
3.3.	Organisation génomique de la séquence codant pour TMD0-CL0 de CrABCC1	92
3.4.	Rétention de l'intron U12 de type AT-AC dans les transcrits de <i>C. roseus</i>	96
3.5.	La localisation tonoplastique du TMD0-CL0 nécessite la 1ère hélice transmembranaire	99
3.6.	Localisation subcellulaire de CrABCC1	103
3.7.	Evaluation du profil d'expression de CrABCC1	109
3.8.	Répartition des ABCCs du clade III parmi les eucaryotes	111
4.	Conclusion	115
	Etude du transporteur AtABCC13 d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	117
II.	Etude du transporteur AtABCC13 d'<i>Arabidopsis thaliana</i>	118
1.	Généralité sur la plante modèle : <i>Arabidopsis thaliana</i>	118
2.	Rappel sur les ABCC d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	120
3.	Résultats et discussions	123
3.1.	Caractérisation d'AtABCC13	123
3.1.1.	Organisation génomique de la région 5' d'AtABCC13.	123
3.1.2.	Caractérisation du promoteur de transcription d'AtABCC13.	126
3.1.2.1.	Profil d'expression d'AtABCC13 au niveau de la plante.	126
❖	Traitements hormonaux et modification de l'activité du promoteur d'AtABCC13	134
❖	Traitements nutritionnels influençant l'expression d'AtABCC13	140
3.1.2.2.	Eléments cis-régulateurs du promoteur d'AtABCC13	142
3.1.3.	Etude des lignées knock-out (KO) pour AtABCC13.	145
3.1.3.1.	Etablissement des lignées homozygotes des KO AtABCC13	145
3.1.3.2.	Tests de croissance	149
3.1.3.3.	Coloration histochimique du phosphate libre	153
3.2.	Conclusion	157
	CHAPITRE V : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE	159
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	165

Listes des figures

- Figure 1:** Représentation schématique des cinq familles de pompes à efflux bactériennes.
- Figure 2:** Arrangement des domaines structuraux des transporteurs ABC.
- Figure 3:** Description des motifs conservés des protéines ABC: Walker A, B et C.
- Figure 4:** La structure de FbpC, domaine de fixation des nucléotides du transporteur de fer "FbpABC" à partir de *N. gonorrhoeae*.
- Figure 5:** Topologie générale du domaine TMD.
- Figure 6:** Représentation schématique du canal CFTR.
- Figure 7:** Les arrangements en domaines les plus fréquents des protéines ABC chez les procaryotes et les eucaryotes.
- Figure 8:** Arrangement des domaines structuraux caractéristiques des transporteurs ABC des principales sous-familles.
- Figure 9:** Modèle illustrant le transport dépendant de l'ATP des transporteurs ABC.
- Figure 10:** Les substrats d'ABCC10.
- Figure 11:** Carte du plasmide pGEM-T Easy (Promega).
- Figure 12:** Carte simplifiée de l'organisation du vecteur pSCA-YFP.
- Figure 13:** dispositif de l'expression transitoire par Agro-transfection en cellules C20D.
- Figure 14:** Etape d'infiltration dans les feuilles de tabac avec Agrobactérie.
- Figure 15:** Canon à particules Biolistic® PDS-1000/HE de bio-rad.
- Figure 16:** Obtention de protoplastes à partir des cellules C20D étiolées
- Figure 17:** Observation aux UV de protoplastes de feuilles de *C. roseus*.
- Figure 18:** Représentation photographique de la Pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*).
- Figure 19:** Biosynthèse des alcaloïdes dans des jeunes feuilles de *C. roseus* et compartimentation tissulaire.
- Figure 19:** Les cellules épidermiques des feuilles de *Catharanthus roseus* exprimant les voies de biosynthèse des AIM, MVA/Triterpène, VLFA et des flavonoïdes.
- Figure 20:** différents compartiments sub-cellulaires de la voie métabolique des AIM.
- Figure 21:** Analyse phylogénétique inter-règnes des transporteurs ABC de type MRP.
- Figure 22:** Alignement de séquences de l'extrémité carboxy-terminale des ABCCs appartenant au clade II.
- Figure 23:** Clonage et caractéristiques de l'ADNc de CrABCC1.
- Figure 24:** Evaluation de l'effet d'attraction des branches longues.
- Figure 25:** Organisation des transcrits différentiels des orthologues de CrABCC1 chez l'homme et la souris.
- Figure 26 :** Organisation génomique des fragments codant pour TMD0-CL0.
- Figure 27:** Topologie prédite de la région TMD0-CL0 déduite de la nouvelle annotation d'AtABCC13 et OsABCC12 (<http://phobius.cbr.su.se>).
- Figure 28:** Comparaison de l'organisation génomique de la région TMD0-CL0 de CrABCC1 et PpABCC1.
- Figure 29:** Description de la rétention de l'intron U12 et l'impact sur l'organisation de la séquence TMD0 de CrABCC1.

Figure 30: Cinétique de la transfection des protoplastes avec la construction 35S: [0-167] TMD0-CL0-YFP.

Figure 31: Localisation subcellulaire des variants de TMD0-CL0 fusionnés à la YFP.

Figure 32: clonage du CrABCC1 en entier dans le vecteur pBi.

Figure 33: Co-cultivation des cellules C20D avec Agrobactérium et la construction CrABCC1-GFP.

Figure 34: Infiltration de feuilles de tabac avec Agrobactérium contenant la construction CrABCC1-GFP.

Figure 35: Expression transitoire par biolistique sur cellules C20D avec la construction CrABCC1-GFP.

Figure 36: L'analyse des données d'expression des valeurs FPKM de CrABCC1.

Figure 37: Analyse phylogénétique des séquences ABCC de plantes et d'animaux décrites dans le tableau 12.

Figure 38: Spécificité des ABCC du clade III.

Figure 39: Présentation photographique des différentes parties d'*Arabidopsis thaliana*.

Figure 40: Analyse phylogénétique des ABCC d'homme et d'*Arabidopsis*.

Figure 41: Validation de la première méthionine d'AtABCC13 par RT-PCR.

Figure 42: Validation de la première méthionine d'AtABCC13.

Figure 43: Représentation schématique de la construction moléculaire de la fusion entre du promoteur de transcription d'AtMRP13 et le gène rapporteur.

Figure 44: AtABCC13 d'*Arabidopsis thaliana* est exprimé dans les tissus vasculaires des organes végétatifs transformés avec la construction promAtABCC13-Gus.

Figure 45: Détail de l'expression d'AtABCC13 au niveau de la pointe de la racine primaire d'*Arabidopsis thaliana*.

Figure 46: AtABCC13 est exprimée pendant la différenciation des racines latérales des plantules âgées de 3 jours.

Figure 47: Détail de l'expression d'AtABCC13 au niveau d'une racine latérale d'*Arabidopsis thaliana*.

Figure 48: Régulation hormonale d'AtABCC13.

Figure 49: Expression d'AtABCC13 dans les organes reproducteurs.

Figure 50: Expression d'AtABCC13 au cours du développement, maturation de la graine et au cours de la germination

Figure 51: Régulation nutritionnelle d'AtABCC13.

Figure 52: Localisation des différents éléments cis régulateurs potentiels situés dans le promoteur d'AtABCC13 en amont du 1er ATG.

Figure 53: Organisation génomique d'AtABC13 et les étapes nécessaires à l'obtention des plantes homozygotes.

Figure 54: Etablissement des lignées homozygotes des Ko AtABCC13.

Figure 55: Exemple de résultats de tests de croissance racinaire sur milieux de culture gélosés complémentés par différents composés.

Figure 56: Coloration histochimique du phosphate libre dans les siliques.

Figure 57: Coloration Gus d'AtABCC13 dans les siliques.

Figure 58: Dosage du phosphate libre dans différents lots de graines.

Liste des tableaux

Tableau 1: Les transporteurs ABC humains et leurs maladies associées.

Tableau 2: la famille des transporteurs ABC chez l'homme.

Tableau 3: Produits aux quels MRP7 peut conférer une résistance.

Tableau 4: Les gènes appartenant à la sous familles ABCC chez *Arabidopsis thaliana*.

Tableau 5: Composition du tampon TENS.

Tableau 6: Tampon d'extraction CTAB.

Tableau 7: liste des principales amorces utilisées pour l'obtention des séquences initiales de *CrABCC1*.

Tableau 8: Composition de la solution isotonique W5.

Tableau 9: Composition de la solution PEG.

Tableau 10: Répartition des loci de *CrABCC1* dans les trois clades de plantes.

Tableau 11: Pourcentages d'identité de séquences protéiques des sous-domaines.

Tableau 12: Représentation des ABCC du clade III parmi les organismes eucaryotes sélectionnés.

Tableau 13: Localisation des différents éléments régulateurs putatifs situés dans la région en amont du site d'initiation de la transcription d'*AtABCC13*.

Tableau 14: différents traitements testés sur les graines d'*Arabidopsis*.

Liste des abréviations

Vinblastine : VBL
vincristine : VCR
ABC : ATP Binding Cassette
MRP : Multidrug Resistance associated Protein
Mef : Membrane facilitator transporter
SMR : Small Multidrug Resistance proteins
MATE : Multidrug And Toxic compound Extrusion
MDR : Multiple Drug Resistance)
FRD3 : Ferric reductase defective 3),
BCD1 : Bush-And-Chlorotic-Dwarf 1
RND : Resistance Nodulation cell Division) :
MFS : Major Facilitator Superfamily)
TMD : TransMembrane Domains)
NBD : Nucleotide Binding Domains
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
PDR : Pleiotropic Drug Resistance
AAA : ATPases Associated with diverse cellular Activities
PBP : Periplasmic Binding Protein
MDS0 : Membrane-Spanning Domain
CL0 : Cytosolic Loop 0
SUR2 : SulfonylUrea Receptor
Kir6 : Potassium inward-rectifier channel 6
TAPL : Transporter Associated with antigen Processing-Like
WBC : White/Brown Complex
PMP : Peroxisomal Membrane Protein
BCRP : Breast Cancer Resistance Protein
ViGS : Virus-induced Gene Silencing
2,4-D : Acide 2,4-dichlorophénoxy-acétique
AACT : Acétoacétyl-CoA thiolase
ABA: Acide abscissique
AIMs : Alcaloïdes Indoliques Monoterpéniques
ANA: Acide 1-naphtalène acétique
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
AS : Anthranilate synthase
ATP : Adénosine triphosphate
B5 : milieu de Gamborg
BAP : 6-benzylaminopurine
BET : Bromure d'éthidium
CaMV : Virus de la mosaïque du chou-fleur

C. roseus : *Catharanthus roseus*
CIAP : Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CPR : Cytochrome P450 réductase
D4H : Désacétoxyvindoline-4-hydroxylase
DAT : Déacétylvindoline-4-O-acétyltransférase
dNTP : Désoxyribonucléoside-triphosphate
DMAPP : Diméthylallyl diphosphate
EDTA : Acide Ethylène diamine tétra-acétique
G10H : Géraniol 10-hydroxylase
GFP : green fluorescent protein
GUS : β -glucuronidase
IPP : Isopentényle diphosphate
IPTG : Isopropyl-thiogalactopyranoside
kDa : kilo dalton
LB : Luria Bertani
MJ : Méthyle jasmonate
MS : Murashige et Skoog
MVAK : Mévalonate kinase
MVA : Acide mévalonique
Pb : Paire de bases
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
SGD : Strictosidine β -D- glucosidase
SDS : Dodécyl sulfate de sodium
SLS : Sécologanine synthase
STR : Strictosidine synthase
T16H : Tabersonine 16-hydroxylase
Taq polymérase : *Thermus aquaticus* polymérase
TAE : Solution de Tris-HCl, acide acétique et d'EDTA
TBE : Solution de Tris-HCl, borate et d'EDTA
TDC : Tryptophane décarboxylase

Introduction Générale

Le cancer, par l'importance du nombre de personnes qu'il atteint constitue un problème majeur de santé publique. Pour y faire face, l'industrie pharmaceutique est continuellement à la recherche de nouveaux médicaments. Les stratégies actuelles de développement de nouveaux médicaments mettent en jeu une panoplie d'approches pour accélérer la découverte et l'évaluation de nouveaux composés. Ces nouvelles molécules peuvent ainsi devenir la base des médicaments de demain. La recherche de nouvelles molécules actives met en évidence l'importance du règne végétal. En effet, les plantes sont une source majeure d'agents anticancéreux originaux dont beaucoup trouvent leur place dans les traitements actuels. C'est le cas par exemple de certains vinca-alcaloïdes extraits de la Pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*). Ainsi, il est naturel d'espérer découvrir de nouvelles molécules actives de plantes. C'est au dix-neuvième siècle que les substances azotées des plantes ont attiré l'attention en découvrant leur action pharmacodynamique. Jean-François Derosne (1774-1855) a effectué le premier isolement de l'opium : mélange de narcotine et de morphine. En 1957, l'effet anti-leucémique de la pervenche qui produit deux principes actifs a été élucidé : la vinblastine (VBL) et la vincristine (VCR), isolés entre 1958 et 1965 (Noble *et al.* 1958). Ces molécules appartiennent à la famille des alcaloïdes indoliques monoterpéniques (AIM), utilisés chez l'homme notamment dans le traitement des cancers du sein, des testicules, des lymphomes et des sarcomes (Casado *et al.* 2007 ; Hassan et Osman, 2010 ; Goto *et al.* 2012). Cependant, certaines tumeurs peuvent développer une résistance aux différents agents anticancéreux : c'est la résistance pléiotropique ou « multidrogue ». Un des mécanismes possibles implique les transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) (Lee *et al.* 2012). Ces protéines, décrites dans tous les organismes vivants, couplent l'hydrolyse d'ATP avec le transport de diverses molécules au travers des membranes biologiques, le plus souvent contre un gradient de concentration : les agents anticancéreux pénétrant passivement dans les cellules sont activement expulsés vers l'extérieur par les protéines ABC surexprimées, atténuant l'effet du traitement (Hopper-Borge *et al.* 2004).

C. roseus produit naturellement des alcaloïdes simples qui seront à leur tour la base pour la synthèse d'autres métabolites secondaires complexes accumulés en très faible quantité dans la plante (Suttipanta *et al.* 2011). Beaucoup d'entre eux sont des molécules de défense pour la plante en réponse aux stress biotiques (Roepke *et al.* 2010).

Les agents anticancéreux et antimitotiques, vinblastine et vincristine, sont des dérivés du couplage bi-indolique (vindoline et catharanthine), alcaloïdes produits exclusivement par

C. roseus. L'accumulation des alcaloïdes est spécifique à certains tissus de la plante. En effet, la vindoline et la catharanthine qui sont les précurseurs de la vinblastine, s'accumulent dans les cellules et les exsudats de feuilles tandis que l'ajmalicine et serpentine, d'autres AIM, se trouvent principalement dans les racines (Roepke *et al.* 2010 ; Suttipanta *et al.* 2011). La vinblastine et la vincristine sont accumulées dans les laticifères et les idioblastes des feuilles (St-Pierre *et al.* 1999). Afin d'améliorer la teneur en alcaloïdes dans la plante et de fournir des sources alternatives d'alcaloïdes bi-indoliques, l'ingénierie métabolique compte sur l'isolement et la caractérisation des gènes impliqués dans leur biosynthèse et leur stockage. Plusieurs gènes de biosynthèse de la vindoline ont été isolés et l'organisation cellulaire et subcellulaire des enzymes correspondantes a été bien étudiée (St-Pierre *et al.* 1999 ; Facchini et de Luca, 2008 ; Suttipanta *et al.* 2011) mais leur stockage *in planta* reste peu documenté.

L'objectif initial de cette thèse était d'identifier des transporteurs de vinca-alcaloïdes chez *C. roseus* dans l'optique d'en comprendre les modes de stockages et d'accumulation. Au regard des capacités de transport des protéines ABC humaines vis-à-vis de la VBL et VCR (Dean, 2002), des orthologues aux gènes humains ont été recherchés chez la plante dans l'idée qu'ils pouvaient partager des capacités de transport communes. C'est donc par une approche phylogénétique menée dans un premier temps sur une comparaison des familles ABC plante/homme, que nous avons pu identifier un candidat unique. Nous nous sommes focalisés sur la caractérisation de ce transporteur ABC de plante appartenant à la sous-famille ABC dénommée *Multidrug Resistance associated Protein* (MRP/ABCC). Cette famille de protéines est particulièrement bien décrite dans la littérature pour son implication dans la résistance aux traitements anticancéreux notamment, via le transport de VBL et VCR (Loe *et al.* 1996 ; Loe *et al.* 1998 ; Renes *et al.* 1999 ; Dean, 2002). Nous avons mis en évidence qu'un seul des sous-groupes phylogénétiques des MRP/ABCC, le clade III, présente la particularité de contenir des gènes de plantes et de mammifères, les autres clades contenant exclusivement des gènes de plante ou des gènes humains. Cette distinction souligne une des originalités du travail entrepris ici. A ce jour, le rôle physiologique des membres de ce clade n'a pas été identifié ni même si ces transporteurs-partagent des similitudes fonctionnelles chez les plantes et les animaux qui marqueraient une fonction ancestrale conservée au sein des deux règnes.

Dans un premier temps, la problématique a été abordée sur la plante médicinale *C. roseus*, naturellement riche en métabolites secondaires. Une analyse *in silico* complète a permis d'identifier les séquences codant pour les MRP/ABCC chez *C. roseus* et d'en

caractériser la distribution phylogénétique. Cette étude a permis de mettre en évidence quelques similitudes géniques entre les homologues humain et de *C. roseus* du clade III des MRP, et de démontrer une relation d'orthologie. Cependant les difficultés techniques inhérentes à l'expérimentation sur cette espèce végétale ainsi que l'ensemble des verrous rencontrés lors des manipulations de *C. roseus* nous ont amené à réorienter la thématique vers la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et son unique gène appartenant au même clade phylogénétique.

Arabidopsis thaliana est depuis plusieurs décennies une plante modèle pour la biologie végétale (Barkla *et al.* 2014). Elle ne présente pas d'intérêt particulier d'un point de vue agronomique ou médical, mais dans une certaine mesure, elle permet d'accélérer la recherche dans le végétal de par les nombreux avantages techniques qu'elle offre. Contrairement à *C. roseus*, le génome d'*Arabidopsis* a été entièrement séquencé, la plante peut facilement être transformée génétiquement et des lignées de mutants sont également disponibles pour la plupart des gènes. Pour ces raisons, la caractérisation fondamentale des MRP/ABCC du clade III débutée sur la plante modèle *C. roseus* s'est poursuivie sur *Arabidopsis*. Cependant, la mise en place des outils moléculaires et génétiques, qui ne préexistaient pas au laboratoire d'accueil mais qui étaient indispensables au développement de ce travail ont nécessité beaucoup de temps et de mises au point, notamment les transformations génétiques d'*Arabidopsis*, la régénération de plantes, les croisements, l'obtention de graines de lignées homozygotes.

Ce travail de thèse ; qui est le fruit d'une cotutelle entre le Laboratoire de Biomolécules et Biotechnologies Végétales UPRES EA 2106 de l'Université François Rabelais de Tours sous la direction du Professeur Benoit St-Pierre et du laboratoire de Biochimie à la Faculté des Sciences de Tunis, sous la direction du Professeur Saïda Triki , se compose de 4 chapitres :

-Le premier chapitre est un rappel des données bibliographiques concernant le thème général des transporteurs. Certains points sont développés plus en détail dans les différentes parties introductives du troisième chapitre, notamment concernant les transporteurs ABC.

-Le deuxième chapitre est consacré aux matériels et méthodes mis en œuvre pour répondre à nos diverses problématiques.

-Le troisième chapitre présente les résultats obtenus au cours de cette étude, accompagnés de discussions. Il décrit l'ensemble des résultats concernant la caractérisation

des homologues du gène humain *HsABCC10* appartenant au clade III des MRP/ABCC chez *C. roseus* puis *A. thaliana*, respectivement *CrABCC1* et *AtABCC13*. Ce chapitre retrace les deux articles publiés sur ces deux gènes pendant la préparation de cette thèse, auquel ont été ajoutés des compléments qui n'apparaissent pas dans les publications.

-Le dernier chapitre est une conclusion générale sur l'étude des transporteurs ABC et plus particulièrement *CrABCC1* de *C. roseus* et *AtABCC13* d'*A. thaliana*. Il aborde aussi les perspectives qui à court terme permettraient d'avancer sur la détermination de la fonction physiologique de ces transporteurs chez la plante. Enfin, les relations entre la résistance aux chimiothérapies VBL et VCR *via* *HsABCC10* et la production ainsi que le transport d'alcaloïdes chez *C. roseus* sont discutées.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Les différents types de transports

Le transport actif primaire est un processus utilisant l'énergie chimique qui lui est directement fournie pour transloquer des composés de part et d'autre des membranes biologiques. L'énergie chimique est généralement produite par hydrolyse d'ATP ou de pyrophosphate (Schmidt *et al.* 1993). La variété des composés transportés est très large et s'étend des macromolécules, aux protons en passant par tous types d'ions (potassium, sodium, calcium, magnésium etc.) (Bastide *et al.* 1973 ; Mandel, 1986 ; Beyenbach, 1990 ; Niinuma *et al.* 1999). Le déséquilibre de charges généré par les mouvements d'ions peut-être la source d'une énergie secondaire pour la cellule définie comme force motrice (gradient de proton) ou gradient électrochimique (gradient d'ions) : cette énergie peut être disponible pour des transports actifs secondaires. Contrairement au transport actif primaire, le transport actif secondaire implique la mise en place préalable d'un gradient électrochimique (Shechter, 1986; Shi, 2013). Les transporteurs lient leurs ligands de la membrane sur un côté et subissent un changement de conformation globale pour les libérer de l'autre côté (Forrest *et al.* 2011) ; selon la nature de l'enzyme, ce transport s'accompagne d'un mouvement d'ions au travers des membranes (Forrest *et al.* 2011). Ces systèmes de transport assurent la circulation des composés dans les différents compartiments subcellulaires, les échanges avec le milieu extérieur mais aussi entre les différentes cellules ou les tissus. Dans la plante, au niveau de la membrane plasmique, le gradient électrochimique est assuré par des transporteurs primaires de type pompes à protons appartenant à la famille des P-ATPases (Sze *et al.* 1999). Au niveau de la membrane vacuolaire, le gradient électrochimique est assuré par des pompes à protons appartenant à la famille des V-ATPases et des V-PPases (Hedrich *et al.* 1989) qui utilisent respectivement l'ATP et le pyrophosphate comme source d'énergie.

Hormis des fonctions physiologiques inhérentes au métabolisme de base, une des fonctions majeure associée aux transporteurs membranaires est la détoxification cellulaire. Les premières pompes à efflux ont été décrites comme des transporteurs drogue-spécifiques conférant à la bactérie *Escherichia coli* une résistance vis-à-vis de la tétracycline (Levy et Mc Murry, 1978). D'autres contribuent de manière significative, à la multi-résistance des bactéries vis-à-vis des antibiotiques (Poole, 2004), tel est le cas des transporteurs secondaires de type Mef (*Membrane facilitator transporter*), qui sont spécifiques d'antibiotiques comme les macrolides (Markham et Neyfakh, 2001). Certains transporteurs sont capables de prendre en charge des composés de structures très différentes (Li et Nikaido, 2004) et participent à

l'élimination des métabolites endogènes ou plus globalement à la sécrétion de produits cellulaires (toxines, bactériocines, facteurs de virulence, ...) (Li et Nikaido, 2009).

Ces systèmes d'efflux appartiennent à 5 familles de transporteurs (Magalhaes, 2010) distinctes en fonction des séquences d'acides aminés qui les constituent (figure 1). L'énergie nécessaire au transport est fournie soit par hydrolyse de l'ATP (Protéine ABC), soit par le gradient électrochimique membranaire : la sortie du substrat étant couplée à l'entrée dans la cellule d'un ion H^+ (protéine RND, MFS, SMR) ou d'un ion Na^+ (protéine MATE). C'est ainsi que les différents transporteurs membranaires ont pu être classés en 5 grandes familles, en se basant sur des données fonctionnelles et phylogénétiques.

-**SMR** (*Small Multidrug Resistance proteins*) : cette appellation est due à leur taille relativement petite ; 110 résidus avec 4 hélices transmembranaires (TM) qui forment des dimers nécessaires pour assurer le transport des drogues (Poulsen et Deber, 2012). Bien que les détails mécanistiques de l'efflux nécessitent encore des éclaircissements, les SMRs facilitent le transport d'une grande variété de désinfectants cationiques, de colorants et d'antibiotiques (Schuldiner, 2009 ; Poulsen et Deber, 2012). QacC (*Quaternary ammonium compound resistance*) a été le premier membre identifié de la famille SMR (Poget *et al.* 2010). Il a été initialement cloné et séquencé à partir des plasmides obtenus des isolats cliniques de *Staphylococcus aureus* résistants aux désinfectants (Littlejohn *et al.* 1991). Peu de temps après, un homologue a été identifié chez *Escherichia coli* « EmrE » (Poget *et al.* 2010). EmrE est l'élément le plus étudié de la famille SMR, il a été cristallisé en tant que homodimère asymétrique lié au substrat TTP^+ (tétraphénylphosphonium) (Chen *et al.* 2007). QacC et EmrE ont été surexprimés, purifiés et reconstitués dans les liposomes, ils transportent une variété de drogues en présence d'un gradient de protons (Poget *et al.* 2010). Les SMRs sont censés être les protéines idéales pour comprendre l'essentiel du transport de nombreuses drogues. Cependant cela s'est avéré beaucoup plus difficile que prévu, avec les résultats contradictoires et controversés (Poget *et al.* 2010).

-**MATE** (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*) : Les transporteurs MATE couplent le transport des substrats aux gradients électrochimiques et sont la dernière classe des MDR (*Multiple Drug Resistance*) structurellement caractérisée (He *et al.* 2010). Ils possèdent une taille d'environ 400 à 700 résidus d'acides aminés avec une caractéristique typique de cette famille qui réside dans la présence de 12 hélices transmembranaires (Omote

et al. 2006). Cette famille est extrêmement flexible à l'égard de la spécificité aux substrats (Magalhaes, 2010), cependant, les deux extrémités N- et C- terminales relativement longues, suggèrent la possibilité d'interactions avec d'autres protéines (Moriyama *et al.* 2008). Chez les plantes, les protéines appartenant à la famille MATE ont connu une expansion remarquable, soulignant l'importance de ces transporteurs au sein de ce règne (Sun *et al.* 2011). La tolérance à l'aluminium dans la plante est en partie conférée par les protéines MATE (Magalhaes, 2010), mais il reste beaucoup à découvrir sur la diversité fonctionnelle et la dynamique de l'évolution qui ont permis à ces protéines d'acquérir les propriétés de transport conduisant à la tolérance à l'aluminium. C'est aussi chez la plante que la fonction physiologique des MATE a été élargie vers des domaines autres que la détoxification. En effet, FRD3 (*Ferric reductase defective 3*), un transporteur de la famille MATE, a été initialement impliqué dans la nutrition en fer chez *Arabidopsis thaliana*, (Green et Rogers, 2004). Il est responsable de l'efflux de citrate dans les tissus vasculaires des racines, le citrate agit ainsi comme un chélateur de fer et permet la distribution de fer dans la plante (Durrett *et al.* 2007). Le transporteur BCD1 (*Bush-And-Chlorotic-Dwarf 1*) appartenant à la famille MATE, contribue également à l'homéostasie du fer durant les réactions de stress et de sénescence chez *Arabidopsis* (Seo *et al.* 2012). Chez les mammifères, les protéines MATE transportent une gamme de cations xénobiotiques structurellement différents dans le foie et les reins, influençant les concentrations plasmatiques de nombreux médicaments, y compris la metformine : un médicament largement prescrit dans le diabète type 2, atténuant ainsi l'efficacité thérapeutique (Becker *et al.* 2009 ; Tsuda *et al.* 2009). Les membres de la famille MATE sont aussi responsables de la résistance aux fluoroquinolones (antibiotiques bactéricides) (He *et al.* 2011). Une analyse phylogénétique effectuée par Hovorup (2003) a souligné la présence de 15 sous-familles, dont sept étaient spécifiques de bactéries, trois spécifiques aux archées et bactéries, une spécifique aux archées, une groupant les protéines de plantes/bactéries et 3 sous familles spécifiques des eucaryotes. Chez *Arabidopsis* cette famille semble avoir subi de nombreux événements de duplication de gènes puisque l'on dénombre 58 paralogues (Li *et al.* 2002 ; Hovorup *et al.* 2003 ; Magalhaes, 2010).

-RND (*Resistance Nodulation cell Division*) : les RND ont été identifiés, dans un premier temps, comme exporteur de lipooligosaccharides bactériens (Saier *et al.* 1998), mais ces transporteurs sont très répandus chez tous les organismes (Doughty *et al.* 2011). Récemment, des progrès considérables ont été accomplis dans l'élucidation des systèmes d'efflux à travers les grands domaines périsplasmiques des transporteurs de type RND (Ohene-

Agyei *et al.* 2012). Cependant très peu d'informations sont connues sur le rôle des acides aminés de la protéine (Ohene-Agyei *et al.* 2012). Ces pompes à efflux sont aussi connues pour être parmi les médiateurs de la multirésistance chez les bactéries gram négatives (Bazzini *et al.* 2011). Les études suggèrent que les RNDs jouent un rôle très important dans la pathogénèse bactérienne, en participant à la colonisation et la résistance bactérienne chez l'hôte, ainsi que dans l'homéostasie des ions métalliques (Piddock, 2006 ; Ma *et al.* 2009 ; Bazzini *et al.* 2011). Ces systèmes RND possèdent des spécificités aux substrats extrêmement larges, ils jouent un rôle de protection des cellules contre l'action des antibiotiques (Matsuo *et al.* 2013). Ils fonctionnent souvent sous forme d'un assemblage de trois composantes. En effet, Le système d'efflux RND est constitué de trois protéines différentes : une protéine de la membranaire, une protéine de fusion et un canal membranaire externe (Matsuo *et al.* 2013).

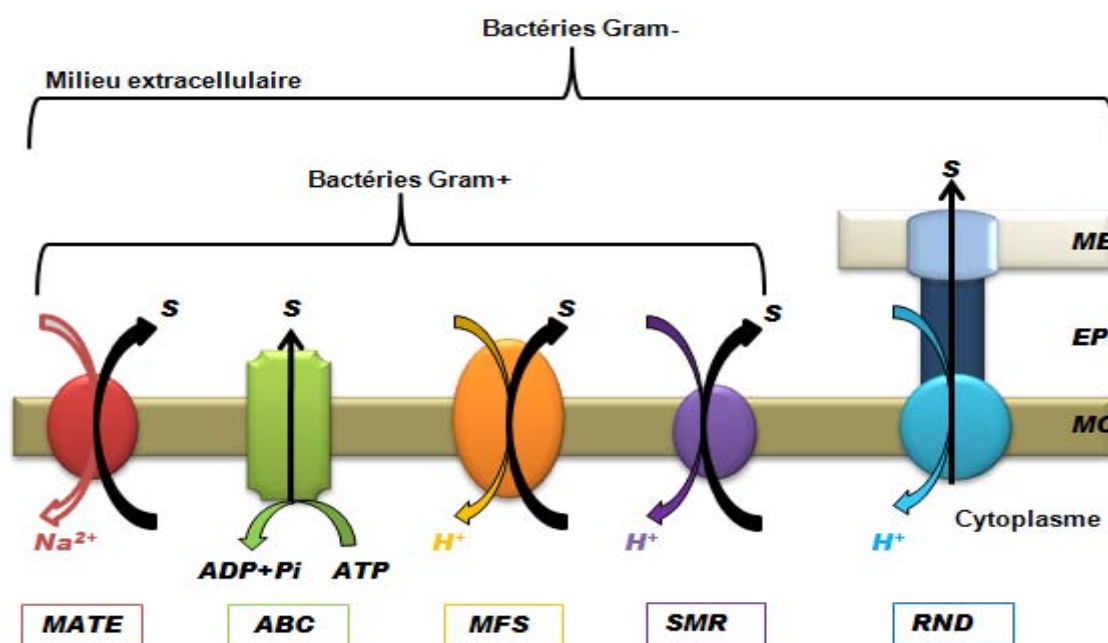


Figure 1: Représentation schématique des cinq familles de pompes à efflux bactériennes.

ME, membrane externe ; EP, espace périplasmique ; MC, membrane cytoplasmique ; S, substrat (dogue). **MATE**: multidrug and toxic compound extrusion. **ABC**: ATP-Binding Cassette. **SMR**: Small Multidrug Resistance. **MFS**: Major Facilitator Superfamily. **RND**: Resistance Nodulation cell Division. (Adapté, d'après Kumar et Schweizer, 2005). Les transporteurs secondaires (MATE, MFS, SMR) peuvent utiliser un gradient de proton ou d'ion selon leur classe comme source d'énergie.

-**MFS** (*Major Facilitator Superfamily*) : les MFS sont présents de façon ubiquitaire chez les bactéries, les archées et les eucaryotes (Pao *et al.* 1998). Ils sont impliqués dans le symport, l'antiport et l'uniport d'une variété de substrats tels que les sucres, les intermédiaires du cycle de Krebs et les oligosaccharides (Putman *et al.* 2000 ; Sahu *et al.* 2012). Ils sont également impliqués dans le transport d'anions inorganiques tels que l'acide urique ou sialique, ou encore certains antibiotiques (Saier *et al.* 1999 ; Reimer et Edwards, 2004). Actuellement cette superfamille est constituée de 74 familles dont chacune transporte un certain type de substrat (Reddy *et al.* 2012). Bien définies phylogénétiquement, de nombreuses familles ne sont pas encore caractérisées fonctionnellement (Reddy *et al.* 2012). Chez l'homme, il existe trois types de transporteurs membranaires MFS. S'ils contribuent largement au transport d'une grande variété de substrats constitués de petites molécules (Pao *et al.* 1998 ; Law *et al.* 2008), certains MFS comme le transporteur « SLC₁₇A₁₋₉ » utilisent un gradient de Na²⁺ comme source d'énergie pour co-transloquer du phosphate (Bergwitz *et al.* 2012). Chez la levure, l'absorption de phosphate est également dirigée par deux transporteurs MFS de type III : Pho84 et Pho89 (Mouillon et Persson, 2006). Fonctionnellement bien caractérisés, Pho84 catalyse le co-transport de proton et de phosphate en milieu carencé, alors acidifié, tandis que Pho89 utilise un gradient de sodium à pH alcalin pour le co-transport Na²⁺/PO₄³⁻ (Bun-ya *et al.* 1991, Persson *et al.* 1998). Les MFS constituent la plus grande superfamille de transporteurs secondaires connus dans la biosphère, ils se caractérisent aussi par une grande diversité fonctionnelle et des implications physiologiques très variées (Reddy *et al.* 2012).

-**ABC** (*ATP-Binding Cassette*) : cette catégorie de transporteurs sera décrite plus en détail dans les points suivant de ce chapitre. Brièvement, ces transporteurs se caractérisent par la présence d'une cassette dans leur séquence associée à la fixation et l'hydrolyse d'ATP. Ce sont des transporteurs primaires qui utilisent directement l'énergie libérée par l'hydrolyse d'ATP pour assurer le transfert de composés de nature très variés au travers de membranes biologiques (Verrier *et al.* 2008). Tous règnes confondus, ils sont répartis dans huit familles phylogénétiques qui sont aussi structurellement différentes et se composent d'une grande variété de pompes à efflux ou influx (Löscher et Potschka, 2005 ; Kooij *et al.* 2012). Décrits dans tous les règnes du vivant, ils sont largement associés aux processus de détoxification cellulaire mais aussi à des fonctions physiologiques propres au métabolisme des différents organismes (Dean *et al.* 2001 ; Löscher et Potschka, 2005 ; Verrier *et al.* 2008 ; Orsi et Tanksley, 2009 ; Tânia *et al.* 2011 ; Kay *et al.* 2012). Dans la dernière décennie, les processus

de transport membranaire ATP-dépendants ont également attiré l'attention depuis que la cause principale de plusieurs maladies chez l'homme ait été liée à la déficience dans ces protéines de transport (Schülein, 2004). En effet, ils sont impliqués dans divers troubles neurologiques comme la maladie d'Alzheimer (Vogelgesang *et al.* 2002 ; Kooij *et al.* 2012), encéphalite à VIH (Langford *et al.* 2004), la maladie de Parkinson (Bartels *et al.* 2008), l'épilepsie (Sisodiya *et al.* 2002 ; Aronica *et al.* 2012) ou encore des troubles respiratoire et digestif comme la mucoviscidose (Cohen et Prince, 2012). Par ailleurs, de nombreux progrès dans la compréhension de la résistance des cellules tumorales aux traitements pharmacologiques ont vu le jour durant ces 35 dernières années, de par la caractérisation de transporteurs ABC (Dean et Allikmets, 1995 ; Dean, 2009). C'est ce qui a incité d'avantage à les étudier d'une manière plus approfondie au niveau fonctionnel.

2. Les transporteurs ABC : définitions et généralités

Contrairement à certaines protéines membranaires qui sont des canaux ioniques ou des transporteurs passifs autorisant le passage des constituants selon leurs gradients électrochimiques, la famille des transporteurs ABC constitue une des plus vaste famille de transporteurs (Lage, 2003) permettant le passage de divers substrats à travers les membranes cellulaires (Rees *et al.* 2009; Joseph *et al.* 2011) contre leur gradient de concentration (Oliveira *et al.* 2011).

Généralement, les transporteurs ABC sont aussi bien des importateurs que des exportateurs (Oldham et Chen, 2011) et sont organisés en quatre domaines peptidiques (figure2): deux domaines transmembranaires (TMD, *TransMembrane Domains*) contenant généralement chacun 6 segments et deux domaines hydrophiles (NBD, *Nucleotide Binding Domains*) impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP, source d'énergie du transport. Les NBD contiennent des séquences hautement conservées appelées Walker A et Walker B, intimement impliquées et nécessaires à la réaction de fixation et d'hydrolyse d'ATP, entre lesquelles se trouve la signature (LSGGQ) appelée « signature C » qui est strictement spécifique des transporteurs ABC. On trouve aussi, des domaines optionnels qui existent chez certains transporteurs ABC, tels que le domaine transmembranaire supplémentaire (TMD0) de la sous-famille MRP/ABCC. Il existe encore d'autres domaines comme le domaine régulateur (R), une grande boucle cytosolique contenant de nombreux sites de phosphorylation. Ces domaines contrôlent souvent l'activité des transporteurs suite à leur phosphorylation comme

c'est le cas du transporteur CFTR/ABCC7 (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) responsable de la mucoviscidose et peuvent être aussi engagés dans des interactions avec d'autres protéines (Wang, 2010).

Les transporteurs ABC ont été découverts et étudiés chez les bactéries dès les années 1950, ils jouent un rôle essentiel dans le métabolisme bactérien (Van Veen et Konings, 1998). Leur nombre est généralement lié à la taille du génome avec environ 2.5%, cependant certaines bactéries du sol présentent un nombre plus élevé de transporteurs ABC correspondant à 40-70% du génome (Giuliani *et al.* 2011). Mais ce n'est que quelques années plus tard que leur présence a été établie dans tout le règne vivant, de la bactérie à l'homme (Higgins, 1992 ; Holland *et al.* 2002). Dans la bactérie *Escherichia coli*, 5 % du génome codent pour 79 transporteurs ABC (Linton et Higgins, 1998). Dans d'autres génomes d'organismes entièrement séquencés comme la levure *Saccharomyces cerevisiae*, 30 protéines ABC potentielles ont été identifiées et sont classées en 6 sous-familles (Decottignies et Goffeau 1997). La similitude structurale entre les ABC de levure et les ABC humains a largement permis d'utiliser *Saccharomyces cerevisiae* comme un organisme modèle pour la caractérisation fonctionnelle de cette famille de transporteurs (Wawrzycka, 2011). En effet chez la levure, la plupart des protéines ABC de type PDR/ABCG (*Pleiotropic Drug Resistance*) ont été associées à la détoxification cellulaire (Sipos et Kuchler, 2006), tandis que chez d'autres champignons pathogènes pour l'homme tels que *Candida albicans* ou *Penicillium digitatum*, ces protéines confèrent une résistance aux traitements fongicides (Prasad et Kapoor, 2005 ; Nakaune *et al.* 1998). Chez l'homme, les protéines ABC comportent 48 gènes fonctionnels (Dean, 2005 ; Piehler *et al.* 2012) et de nombreux pseudogènes (Piehler *et al.* 2006-2008). Chez les plantes, Et contrairement l'analyse des génomes d'*Arabidopsis thaliana* et du riz a révélé que les plantes codent pour plus de 100 transporteurs ABC (Sánchez-Fernández *et al.* 2001, Garcia *et al.* 2004 ; Yazaki *et al.* 2009), soit deux à trois fois plus que les génomes d'animaux et de microbes. Cependant chez *Arabidopsis*, seulement 22 des 130 protéines ABC ont été analysées fonctionnellement à ce jour (Kang *et al.* 2011). Elles accomplissent une multitude de fonctions et sont localisées dans les membranes cellulaires telles que la membrane plasmique, tonoplaste, chloroplastes, mitochondries, réticulum endoplasmique ou péroxysomes (Kang *et al.* 2011).

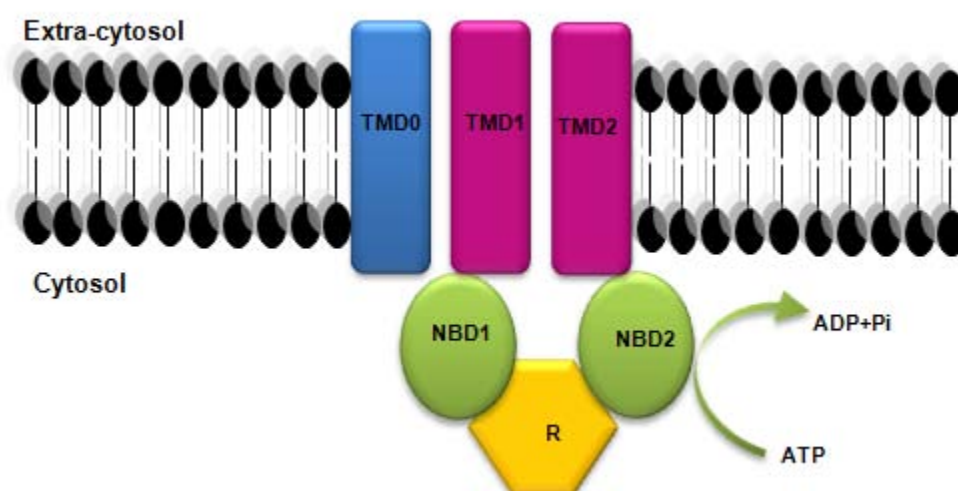


Figure 2: Arrangement des domaines structuraux des transporteurs ABC.

Un transporteur ABC comporte 4 domaines: 2 domaines transmembranaires (TMD, rose) et 2 domaines de liaison des nucléotides (NBD, vert). Des domaines optionnels existent chez certains transporteurs ABC, tels que les domaines régulateurs (R, jaune) ou un domaine transmembranaire supplémentaire (TMD0, bleu).

3. Organisation en domaines des transporteurs ABC

3.1. Les domaines NBD : Domaines de liaison des nucléotides

Les NBD constituent, grâce à l'énergie d'hydrolyse de l'ATP qu'ils catalysent, le moteur qui provoque le passage du substrat à travers la membrane, par changement conformationnel (Chang et Roth, 2001 ; Locher *et al.* 2002). Les NBD sont hydrophiles, localisés dans le cytosol, et interagissent avec les boucles intra-membranaire des TMD. Il est important de noter que la conservation de ces domaines permet de définir et de délimiter l'appartenance à la super-famille des protéines ABC. Cette super-famille se caractérise par la présence de plusieurs motifs hautement conservés sur le domaine NBD : les Walkers A et B identifiés en 1982 (Walker *et al.* 1982), la distance entre ces deux motifs variant de 100 à 190 résidus (Saurin *et al.* 1999) ; la signature ABC, appelée aussi Walker C, située entre les deux motifs précédents (Shyamala *et al.* 1991) ; et les deux boucles Q et H (figure 3). Parmi les protéines ABC, certaines sont qualifiées de transporteurs ABC par la présence de domaines hydrophobes associés à ces motifs.

Le motif Walker A : pour les protéines ABC, Schneider et Hunke (1998) proposent la séquence consensus G-xx-G-x-G-K-[ST] avec x considéré comme un acide aminé quelconque (Oldman et Chen, 2011).

Le motif Walker B : est plus variable et possède 4 résidus hydrophobes suivis de résidus chargés négativement (Oldman et Chen, 2011). Dans les protéines ABC, le résidu situé juste après l'aspartate (D) est aussi très conservé, le plus souvent un acide glutamique (E) (Decottignies et Goffeau, 1997), ainsi que d'autres résidus situés en aval du Walker B. Tous ces résidus forment ensemble le "Walker B étendu" dont la séquence consensus proposée par Saurin et ses collaborateurs (1999) est « illlDEptsalD » (Saurin *et al.* 1999), en plus des acides aminés moins conservés en minuscules (figure 3).

La signature ABC ou motif C : est spécifique des protéines ABC (Hyde *et al.* 1990). Elle a jusqu'à 15 acides aminés de long et commence généralement par la séquence LSGGQ (figure 3). Une séquence consensus localisée juste en amont du Walker B (Bairoch, 1992), de la forme LSGGQ-[QRK]-QR a été proposée par (Schneider et Hunke, 1998). Le motif C des transporteurs ABC, le distingue des autres enzymes utilisant l'ATP comme source d'énergie, comme par exemple les pompes à protons «H⁺ATPases» ou d'autres ATPases possédant également les Walker A ou B appartenant à la classe générale des protéines AAA (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*) (Iyer *et al.* 2004). L'identité de séquences en acides aminés entre les différentes protéines ABC peut être très faible, sauf dans les zones conservées des NBD, où elle est généralement comprise entre 30 et 40% (Hyde *et al.* 1990).

La boucle Q : est un motif structural formé par les résidus situés après une glutamine invariable (Oldman et Chen, 2011) très conservée localisée entre le Walker A et la "signature ABC" (Decottignies et Goffeau, 1997 ; Hyde *et al.* 1990).

La boucle H ou région « Switch » (Oldman et Chen, 2011), est aussi un motif structural formé autour d'une histidine localisée à une trentaine de résidus après le Walker B (Decottignies et Goffeau, 1997) (figure 3).

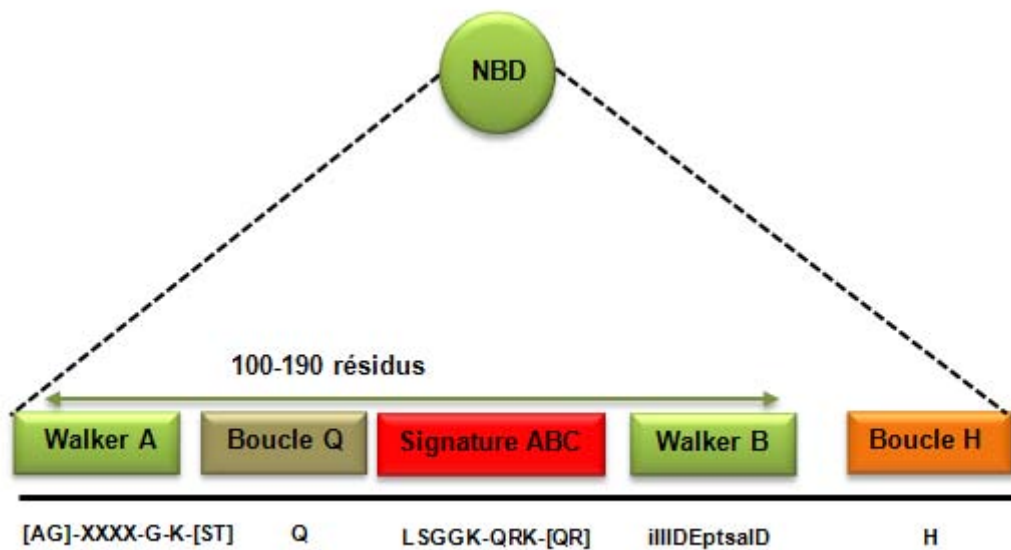


Figure 3: Description des motifs conservés des protéines ABC: Walker A, B et C.

Séquences protéiques des trois motifs Walker. Les séquences sont représentées par l'alignement horizontal des acides aminés en code d'une lettre. X désigne n'importe quel acide aminé.

3.1.1. Structure des domaines de liaison des nucléotides (NBD)

La présence de deux NBD est nécessaire au fonctionnement d'un transporteur (Azzaria *et al.* 1989 ; Gill *et al.* 1992). Cependant le mécanisme précis par lequel les NBD aident au transport des substrats à travers les membranes cellulaires comporte encore quelques points d'ombre à ce jour (Newstead *et al.* 2009). Dans les dernières années, plusieurs structures à haute résolution des transporteurs ABC, ont été déterminées par cristallographie aux rayons X (Hollenstein *et al.* 2007 ; Oldhman *et al.* 2008 ; Rees *et al.* 2009) et présentent toutes un repliement très similaire. La première structure publiée d'un domaine NBD a été celle du transporteur d'histidine HisP de *Salmonella typhimurium* (Hung *et al.* 1998). Certains cristaux des NBD ont été obtenus sous forme d'assemblage en dimères (Kerr, 2002), d'autres structures ont été rapportées : MJ1267 (Karpowich *et al.* 2001), MJ0796 (Yuan *et al.* 2001) et TAP1/ABCB2 (Gaudet et Wiley, 2001) mais n'ont pas résolu la question sur la nature de l'interface de ces dimères. Plus récemment, la structure du NBD1 d'ABCC7/CFTR a été résolue (Lewis *et al.* 2004), ce NBD1 possède un segment régulateur supplémentaire, une interconnexion entre les domaines et une conformation inhabituelle du nucléotide, ce qui le différencie des autres NBD. Newstead et ses collaborateurs (Newstead *et al.* 2009), ont résolu

la structure du domaine NBD « FbpC » du transporteur de fer « FbpABC » chez *N. gonorrhoeae*. FbpC comprend 352 acides aminés (figure 4 A, B). Il s'agit de la première observation en trois dimensions d'un domaine NBD chez les importateurs ABC jusqu'à ce jour. La structure cristalline a été déterminée à une résolution finale de 1,9 Å et raffinée à un facteur de 18.6% (Newstead *et al.* 2009). Les 240 premiers acides aminés de chaque monomère FbpC montrent la même topologie et les mêmes séquences observées précédemment au niveau des structures NBD des transporteurs ABC (Oswald *et al.* 2006). Les détails de la façon dont la liaison et l'hydrolyse de l'ATP conduisent au transport du substrat ne sont pas bien connus et étant donné que les NBD des différents transporteurs présentent des homologies de structures et de séquences, il est généralement admis qu'il existe un mécanisme universel. Généralement les mécanismes proposés sont classés comme étant soit séquentiels soit alternés (Newstead *et al.* 2009). Ces termes ne sont pas clairement définis dans la littérature. Cependant, nous pourrions définir un mécanisme alterné comme étant celui où une seule molécule d'ATP est hydrolysée à un moment donné (Jones and George, 2009 ; Oldham *et al.* 2008; Sauna and Ambudkar, 2007), en outre un mécanisme séquentiel est celui par lequel la liaison de l'ATP entraîne le coup d'énergie (Higgins and Linton, 2004; Janas *et al.* 2003; Linton and Higgins, 2007; Moody *et al.* 2002; Oldham *et al.* 2008).

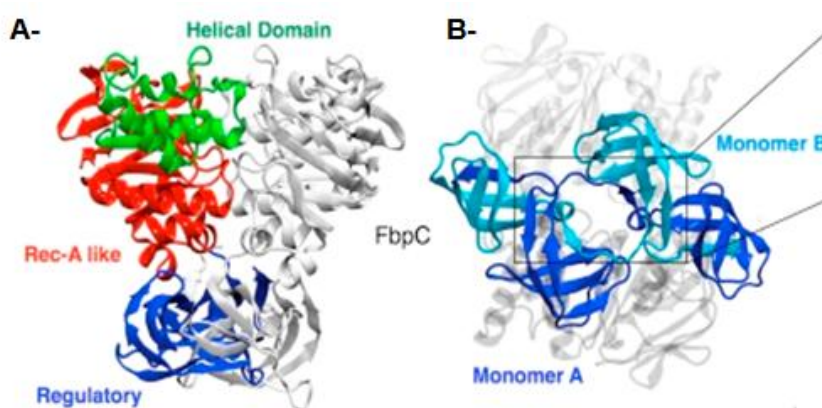


Figure 4: La structure de FbpC, domaine de fixation des nucléotides du transporteur de fer “FbpABC” à partir de *N. gonorrhoeae*.

A- Vue de côté de FbpC avec les domaines hélicoidaux, Rec-A-like et les domaines régulateurs de couleur verte, rouge et bleu respectivement. **B-** Les domaines régulateurs de FbpC vu de dessous montrant le domaine d'échange. Les domaines de chaque monomère sont colorés en bleu foncé et en bleu clair. D'après Newstead *et al.* 2009.

3.1.2. *Interactions entre les domaines NBD*

Les domaines NBD peuvent interagir ensemble de différentes manières, en effet trois arrangements ont été observés pour l'interface entre deux NBD : dos à dos, tête-tête et tête-bêche. Le premier dimère observé a été celui formé par la protéine HisP de *Salmonella typhimurium* (Hung *et al.* 1998). Dans le cristal, deux protéines HisP s'associent dans une orientation dos à dos. La deuxième conformation « tête-tête » est illustrée par les NBD du transporteur du maltose (MalK) de *Thermococcus littoralis* (Diederichs *et al.* 2000). Dans le cas de la protéine Rad50 (Rad50cd) de *Pyrococcus furiosus* qui peut être complexée soit à l'AMP-PNP-Mg²⁺ soit à l'ATP (Hopfner *et al.* 2000), la structure de l'unité cristallographique montre le dimère dans une conformation tête-bêche. Rad50 est une protéine ABC qui n'est pas associée à des activités de transport, mais à la réparation d'ADN double brin. Généralement dans la classe des transporteurs ABC « full-size », codés par un gène portant 2 NBD et 2 TMD, les NBD contenant les motifs conservés tels que les motifs du Walker A et le motif LSGGQ, sont orientés dans un arrangement tête-bêche (Locher, 2009). Par exemple, Li *et al.* (2007) ont montré que les deux NBD de la protéine CFTR/ABCC7 fonctionnent en un dimère tête-bêche avec les sites de liaisons de l'ATP situés à l'interface des deux sous-unités. Les données suggèrent qu'un site de liaison d'ATP est formé par le Walker A et B du NBD1 associé au motif LSGGQ d'NBD2 tandis que l'autre site est formé par le Walker A et B du domaine NBD2 associé au motif LSGGQ d'NBD1 (Li *et al.* 2007). Conformément à ce modèle d'NBD, les études fonctionnelles ont montré que l'association des deux NBD est nécessaire pour avoir une activité ATPase optimale (Kidd *et al.* 2004) et pour l'ouverture du canal, tel est le cas la protéine ABCC7 (Vergani *et al.* 2005).

L'interaction entre les 2 domaines NBD du transporteur ABC humain ABCC1 est dépendante de la présence d'ATP et implique la séquence signature caractéristique de cette famille de protéine. En effet, dans le modèle de cycle catalytique alternatif, seule une molécule d'ATP est hydrolysée, avec une activité ATPase qui alterne entre les NBD (Senior et Gadsby, 1997 ; Hrycyna *et al.* 1999). Il a été même proposé que l'ATP et le GTP puissent se lier sur le même site (Randak *et al.* 1996). D'autre part il a été admis que pendant un cycle catalytique de transport unique, deux molécules d'ATP sont consommées, ce qui est cohérent avec une coopérativité positive observée pour l'hydrolyse d'ATP chez plusieurs transporteurs ABC (Senior et Bhagat, 1998 ; Locher, 2009).

Dans le cas du récepteur humain des sulfonylurées (SUR2) codé par le gène ABCC9, le NBD1 est doté d'une activité catalytique plus limitée que le NBD2 (Inagaki *et al.* 1996 ; Ueda *et al.* 1999 ; Bienengraeber *et al.* 2000 ; Zingman *et al.* 2002 ; Park *et al.* 2008). Une telle asymétrie, distingue ABCC9 des transporteurs ABC traditionnels (Zingman *et al.* 2001). Cependant, bien qu'il ait été classé dans la famille des transporteurs ABC, c'est en réalité un modulateur de canaux potassiques qui ne possède pas d'activité de transport proprement dit. De nombreuses études ont également révélé des asymétries dans la structure et la fonction des domaines NBD de la protéine CFTR/ABCC7 (Gadsby et Naim, 1999 ; Sheppard et Welsh *et al.* 1999) suggérant que les deux sites de liaison d'ATP n'ont pas de fonctions équivalentes. Par exemple, en utilisant la photo-affinité, Aleksandrov et ses collaborateurs (2002) ont montré que NBD1 lie de manière stable les nucléotides, alors que NBD2 les hydrolyse plus rapidement.

3.2. Les domaines TMD : Domaines transmembranaires

A l'instar des NBD, 2 TMD sont nécessaires pour l'assemblage d'un transporteur ABC complet et fonctionnel. Les domaines TMD sont formés par les hélices α hydrophobes transmembranaires et des boucles cytosoliques ou extra-cytosoliques qui font la liaison entre ces hélices (Jones et George, 2004). Ils renferment généralement six segments transmembranaires, bien que ce chiffre puisse être variable, soit un total de douze hélices par transporteur, séparés par trois boucles extracellulaires et deux intracellulaires (figure 5). L'organisation des boucles a été résolue par la structure cristalline du transporteur molybdate/tungstate « ModBC » d'*Archaeoglobus fulgidus* (Hollenstein *et al.* 2007 ; Locher, 2009). ModBC appartient à la classe des importateurs de type I ; ces médiateurs de l'absorption d'ions, sucres, acides aminés ou autres substrats fonctionnent avec une protéine additionnelle PBP (*Periplasmic Binding Protein*) qui capture le substrat par des liaisons spécifiques et le livre ensuite au transporteur (Davidson et Chen, 2004). Leurs TMD sont constitués de 12 hélices α . Les importateurs de type II qui facilitent l'adoption des chélates métalliques généralement plus grand que les substrats des importateurs ABC de type I, ont une architecture distincte concernant les régions TMD, avec 10 hélices pour chaque sous-unité TMD, soit un total de 20 segments transmembranaires dans un transporteur assemblé (Locher, 2009 ; Rees *et al.* 2009). Cette architecture a été révélée dans la structure cristalline du transporteur de la vitamine B12 « BtuCD » chez *E. coli* (Locher *et al.* 2002). Depuis, deux autres structures cristallines ont été déterminées, celle de la protéine homologue (HI1740/71)

de *Haemophilus influenzae* (Pinkett *et al.* 2007) et celle de la protéine BtuCD dans un complexe avec sa protéine de liaison à la vitamine B12, BtuF (Hvorup *et al.* 2007). D'autre part, il existe deux types d'hélices transmembranaires, celles nommées « simples » avec une hydrophobicité élevée, une faible complexité de séquences et un enrichissement en résidus aliphatiques, et celles avec une faible hydrophobicité, une complexité de séquences élevée et quelques résidus fonctionnels (Wing-Cheong Wong *et al.* 2011). La nature structurale des TMD qui consiste principalement en un enchainement d'acides aminés hydrophobes de petites tailles, les rend difficilement identifiables dans l'analyse des génomes lorsqu'ils ne sont pas directement associés aux NBD.

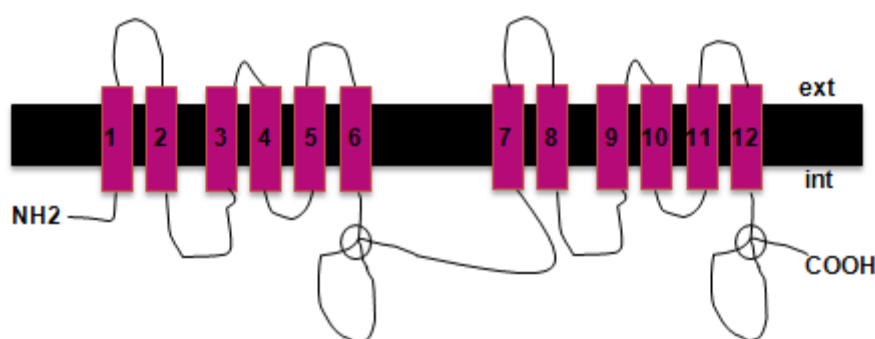


Figure 5: Topologie générale du domaine TMD

Ces domaines renferment six segments transmembranaires (douze hélices par transporteur), séparés par trois boucles extracellulaires et deux intracellulaires.

3.2.1. Rôle des domaines transmembranaires (TMD)

La structure, la disposition ainsi que les séquences des TMD sont variables d'un transporteur à l'autre, reflétant la diversité chimique des substrats transportés (Rees *et al.* 2009). Généralement, les domaines transmembranaires (TMD1 et TMD2) des protéines ABC, interviennent dans la formation du pore par lequel le substrat traverse la membrane. Il semble également que les TMD confèrent la spécificité aux substrats. En effet, des mutations dans les domaines transmembranaires peuvent conduire à des changements de spécificité (Ehrle *et al.* 1996). Chez certains transporteurs ABC humain, tel que la *p-glycoprotéine* P-gp (appelé encore MDR1 ou ABCB1), un transporteur ABC localisé dans la membrane plasmique des cellules de mammifères et responsable de la résistance aux médicaments anticancéreux, les TMD seuls forment le pore membranaire ; alors que chez d'autres transporteurs, tels que les

translocons de protéine ; des protéines additionnelles peuvent être impliquées (Garrigues *et al.* 2002 ; Loo *et al.* 2003b-c ; Maki *et al.* 2003). Les travaux de Gottesman et Pastan (1993) ont montré que le transporteur ABCB1 fonctionne comme un «aspirateur», les substrats entreraient dans la bicouche lipidique par diffusion puis seraient extraits par la P-gp, vers la poche de fixation, hydratés (Loo *et al.* 2004) et enfin transportés vers l'extérieur de la cellule. Récemment, une autre hypothèse a été émise selon laquelle les substrats passeraient passivement par des "portes" ouvertes entre les hélices transmembranaires en se déplaçant dans la bicouche phospholipidique pour arriver à leur site de fixation (Loo et Clarke, 2005). Donc, la liaison du substrat est en effet une propriété des TMD, mais le transport en lui-même requiert l'interaction des quatre domaines TMD-NBD. D'autres fonctions des domaines transmembranaires ont été également découvertes au niveau de CFTR/ABCC7. En effet, une des propriétés de la protéine qui la différencie des autres transporteurs ABC est que les TMD forment un canal sélectif d'ions Cl⁻ déclenché par l'activation enzymatique et la liaison de l'ATP (Li *et al.* 2007). Au niveau de la protéine CFTR/ABCC7, le TMD1 joue un rôle important dans la conductance et la sélectivité (Devidas et Guggino, 1997) alors que le domaine TMD2 est peu impliqué. Les segments membranaires M1, M5 et M12 sont impliqués dans la zone formant le pore (Tabcharani *et al.* 1992 ; McCarthy *et al.* 1993 ; McDonough *et al.* 1994 ; Schwiebert *et al.* 1998). Le segment transmembranaire M6, possédant une structure secondaire essentiellement formée d'une hélice α dont l'une des faces est exposée à la lumière du canal (Akabas *et al.* 1994-1997), joue un rôle crucial dans la détermination des propriétés du pore de la protéine CFTR/ABCC7 (Sheppard et Welsh *et al.* 1999 ; McCarty, 2000 ; Linsdell, 2006 ; Li *et al.* 2007). En effet, les changements de conformation du segment M6 (passage d'une hélice α à un feuillet β) influent sur la sélectivité et l'ouverture du canal (Wigley *et al.* 1998). Les TMD semblent être aussi impliqués dans la reconnaissance de la molécule libérée par les PBP qui lie le substrat et le présente au transporteur (Shuman, 1982 ; Speiser et Ames, 1991).

3.3. Autres domaines

De nombreux transporteurs ABC présentent des domaines auxiliaires qui ont des fonctions spécifiques. Comme par exemple, le domaine additionnel régulateur intrinsèque 'R' de la protéine CFTR/ABCC7 qui est le plus étudié (figure 6). Au niveau de la protéine, ce domaine, contrôle l'activité du canal à chlore par son état de phosphorylation (Gadsby et Naim, 1999 ; Roosbeek *et al.* 2004). En effet, le domaine régulateur est un domaine non

structuré possédant 14 sites de phosphorylation (Guangyu, 2010) qui stimulent la fonction en améliorant l'interaction de l'ATP avec les NBD (Li *et al.* 2007). Ce domaine qui relie les deux moitiés TMD-NBD de la protéine CFTR/ABCC7 (Ostedgaard *et al.* 2001), ne présente pas une structure tertiaire stable (Marasini *et al.* 2012). Le caractère désordonné de ce peptide est directement en corrélation avec la fonction régulatrice du domaine R dont la structure serait en permanence modulée par les événements de phosphorylation qu'il subit (Marasini *et al.* 2012).

Un autre domaine caractéristique de certains transporteurs ABC est un troisième domaine transmembranaire formant une extension N-terminale, nommée TMD0 (ou MDS0, *Membrane-Spanning Domain*). La plupart des transporteurs « full size » appartenant à la sous famille ABCC possèdent le domaine supplémentaire TMD0 à l'extrémité N-terminale de leur chaîne polypeptidique (Hipfner *et al.* 1997 ; Tusnady *et al.* 1997 ; Deeley et Cole, 2003). Les TMD0 sont peu conservés au niveau de leur séquence peptidiques par rapport à la région TMD (Tusnady *et al.* 1997 ; Gao *et al.* 1998). Cependant, ils renferment généralement tous 5 hélices α transmembranaires qui ne semblent pas directement intervenir dans les processus de transport ni l'hydrolyse d'ATP, principalement dirigés par les TMD et NBD, néanmoins, les études de trois protéines ABCC, SUR1A, MRP2, et YCF1, indiquent que TMD0 présente au moins un rôle partiellement conservé dans le trafic des protéines (Fernandez *et al.* 2002; Mason et Michaelis, 2002; Babenko et Bryan, 2003).

Chez la levure par exemple, parmi les six ABCC identifiés, 5 possèdent un TMD0 et sont localisés au niveau du tonoplaste et un seul, sans TMD0, au niveau du plasmalemme, ce qui semble suggérer l'importance de ce domaine dans l'adresse à la membrane vacuolaire. Pourtant chez l'homme, parmi les 12 MRP/ABCC, 7 transporteurs sont équipés d'un TMD0 et 5 en sont dépourvus, pourtant ils sont tous décrits au plasmalemme (Paumi *et al.* 2009). Des études par mutagenèse ou délétion du TMD0 indiquent que le rôle de ce domaine peut-être variable selon les différents MRP/ABCC ; il peut effectivement être essentiel pour l'adressage subcellulaire, la distribution dans certaines cellules polarisées, mais aussi pour l'activité ATPasique, de reconnaissance du substrat ou encore d'interaction avec des partenaires protéiques (Frelet et Klein, 2006 ; Paumi *et al.* 2009).

Les domaines TMD0 sont reliés au corps des protéines ABCC par une boucle cytosolique d'une centaine d'acides aminés, le CL0 (*Cytosolic Loop 0*). Ici aussi, cette boucle a une séquence peu conservée au sein des ABCC et peut être impliquée dans la

reconnaissance du substrat, le transport ou encore l'adressage subcellulaire (Frelet et Klein, 2006). Cette boucle cytosolique est particulièrement bien documentée pour la protéine SUR2/ABCC8 (*SulfonylUrea Receptor*). SUR2 est la seule protéine ABC connue pour fonctionner comme une sous-unité accessoire de régulation (Fang *et al.* 2006). Elle prend en charge les fonctions de régulation du canal potassique sensible à l'ATP, Kir6 (*Potassium inward-rectifier channel 6*). Des modèles structuraux offrent un aperçu de la façon dont un tétramère SUR2 interagit physiquement avec 4 sous-unités Kir6 et mettent en avant le rôle prépondérant des domaines CL0 et TMD0 dans les interactions de ce super-complexe. Cependant, ces deux domaines ABC atypiques (TMD0-CL0), nécessitent la présence de l'ensemble du transporteur ABC (TMD-NBD) pour qu'un canal potassique soit fonctionnel (Fang *et al.* 2006).

Enfin, un domaine transmembranaire additionnel a également été décrit pour le transporteur homodimérique TAPL/ABCB9 (*Transporter Associated with antigen Processing-Like*) appartenant à la sous-famille ABCB chez l'homme ; c'est le seul ABCB connu possédant une telle extension N-terminale (Dean, 2002). Les données sur l'hydrophobicité de ce domaine prédisent 4 hélices α transmembranaires ce qui le diffère des TMD0 décrits précédemment chez les ABCC (Demirel *et al.* 2010). Par ailleurs, la séquence du TMD0 de TAPL/ABCB9 semble spécifique à cette protéine puisqu'elle ne présente aucune homologie significative avec les autres séquences de transporteurs ABC. Ici, le TMD0 est un module nécessaire et suffisant pour le trafic de la protéine vers le lysosome mais il n'est pas indispensable pour les activités de transport de peptides vers la lumière du lysosome (Demirel *et al.* 2010). Demirel *et al* ont également montré qu'une version du TAPL /ABCB9 tronquée, exprimée sans l'extension TMD0, se situe au plasmalemme comme les autres ABCB humains, alors que la co-expression du TMD0 avec le TAPL/ABCB9 tronqué localise l'ensemble au lysosome. Les auteurs suggèrent que la TMD0 serait à l'origine codée par un gène lié à l'adressage au lysosome qui aurait été fusionné à un gène codant un ABCB, formant ainsi TAPL/ABCB9.

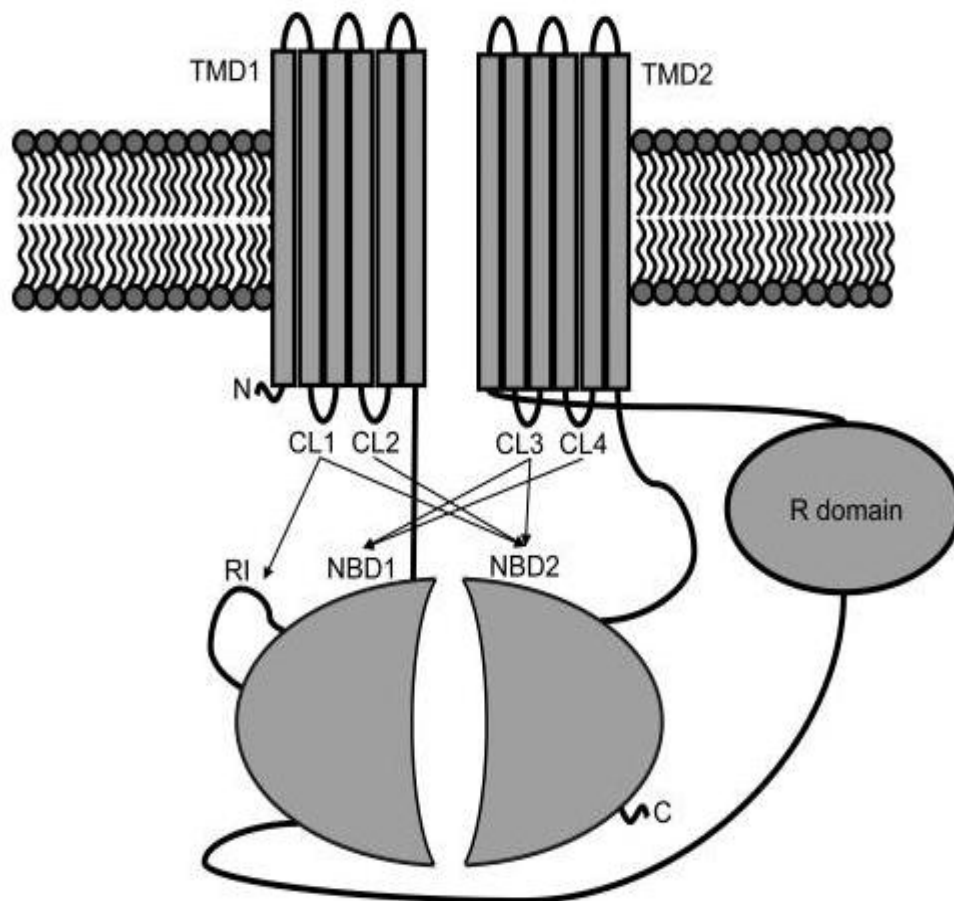


Figure 6: Représentation schématique du canal CFTR.

CFTR est composé de deux NBD (NBD1, NBD2), deux domaines transmembranaires (TMD1, TMD2) et un domaine régulateur (R). Les fleches indiquent les interactions confirmées entre les domaines NBDs et les loupes cytosoliques des TMD (d' après He *et al.* 2008).

4. Organisation modulaire et sous-familles de protéines ABC

L'organisation structurelle des transporteurs ABC est aussi variée que leurs fonctions. C'est ce qui amène à la répartition de cette super-famille en sous familles caractérisées par l'organisation des différents domaines (TMD et NBD). Un transporteur ABC fonctionnel est nécessairement constitué par 2 TMD et 2 NBD ; la distribution et l'orientation de ces domaines entre eux a permis de définir 8 sous-familles, de ABCA à ABCH. Chez les procaryotes, beaucoup de transporteurs ABC sont des complexes multi-protéiques dont les quatre modules sont codés par des polypeptides séparés. Les différents domaines structuraux (les deux NBD et les deux TMD) sont souvent arrangés dans un opéron unique et sont

généralement synthétisés sous forme de sous-unités protéiques séparées ou de domaines assemblés par deux (Higgins, 1992 ; Dean et Allikmets, 1995). Différentes associations homodimériques ou hétérodimériques de domaines simples ont été retrouvées (figure 7A). Chez les eucaryotes, un gène peut contenir deux ou quatre domaines fusionnés pour coder un polypeptide unique (Linton et Higgins, 1998). Les transporteurs eucaryotes peuvent être composés de quatre domaines fusionnés en un seul gène codant pour un transporteur «full-size» dont l'orientation *Forward* (directe) est «TMD-NBD-TMD-NBD» (figure 7B). Cette orientation caractérise les transporteurs dont les domaines transmembranaires précèdent les domaines de fixation des nucléotides comme par exemple dans le cas de STE6 chez la levure ou ABCB1 chez l'homme. Contrairement à une orientation *Reverse* (inversée) «NBD-TMD-NBD-TMD» décrite en premier lieu pour PDR5 chez la levure (figure 7B). Les noms donnés aux différents transporteurs sont d'origine historique et sont en lien avec la fonction initialement associée. Certains membres ne sont pas clairement impliqués dans le transport de molécules organiques et fonctionnent, par exemple, comme canaux à ions ou régulateurs de canaux (exemples CFTR/ABCC7, SUR2/ABCC8). Aujourd'hui, ces topologies définissent trois groupes de transporteurs ABC "full-size": les MDR/ABCB (*MultiDrug Resistance*) en orientation directe (figure 8A) ; les PDR/ABCG (*Pleiotropic Drug Resistance*) en orientation inverse (figure 8B) et les MRP/ABCC (*MultiDrug Resistance associated Protein*) en orientation directe (figure 8C). Les protéines ABC «half size» (figure 8 D, E) composées d'un NBD fusionné à un TMD, tels que les transporteurs WBC/ABCG (*White/Brown Complex*) ou PMP/ABCD (*Perixisomal Membrane Protein*), sont capables de dimériser et fonctionner en tant qu'homo ou hétéro dimères (Ewart *et al.* 1994). Finalement, quelques membres de la famille ABC, qui ne sont pas dotés de propriétés de transport, semblent avoir différentes organisations seulement avec les domaines NBD. Ils participent à diverses fonctions telles que l'activité nucléase (RNase L) ou encore la régulation de l'activité de la Protéine Kinase (GCN20) (Vazquez de Aldana *et al.* 1995).

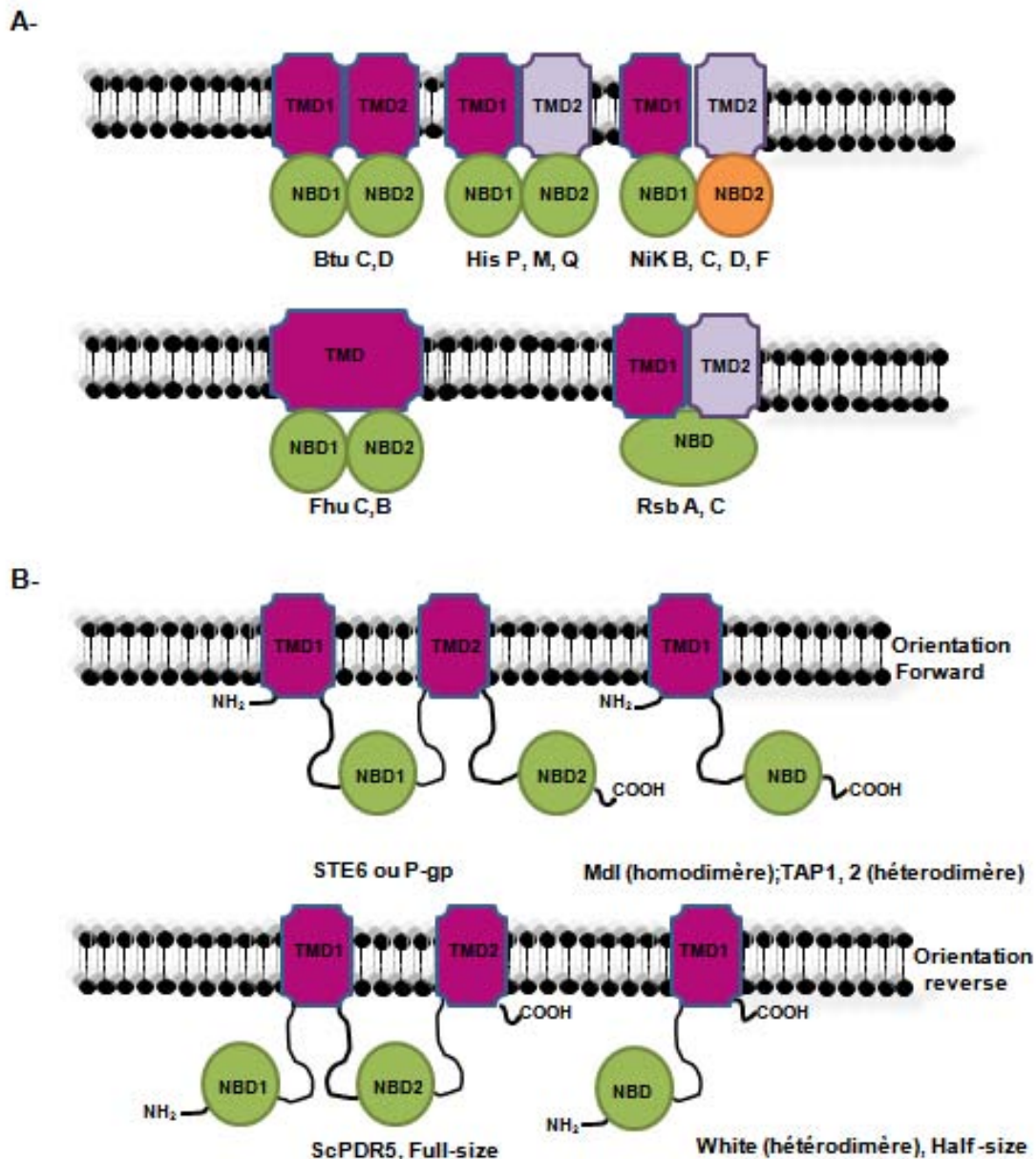


Figure 7: Les arrangements en domaines les plus fréquents des protéines ABC chez les procaryotes et les eucaryotes.

A- Organisation en domaines des ABC transporteurs procaryotes. Le système de base est représenté comme un ensemble de 4 sous unités : 2TMD et 2 NBD. Exemple de l'architecture en domaines des protéines ABC procaryotes (importeurs): Btu, vitamine B12; His, Histidine; Nik, Nickel; Fhu, siderophore/vitamine B12; Rbs, ribose. **B-** Organisation en domaines des ABC transporteurs eucaryotes. B- Exemple de l'architecture en domaines des protéines ABC eucaryotes: STE6, yeast pheromone-peptide; P-gp, humain multidrug; Mdl, yeast mitochondrial peptide; TAP1/2, humain peptide; ScPDR5, yeast pleiotropic drug résistance; White, transporteur de pigments. L'organisation en domaines est schématique, les semi-transporteurs vont se rassembler dans une structure homo ou hétérodimérique pour former un transporteur actif.

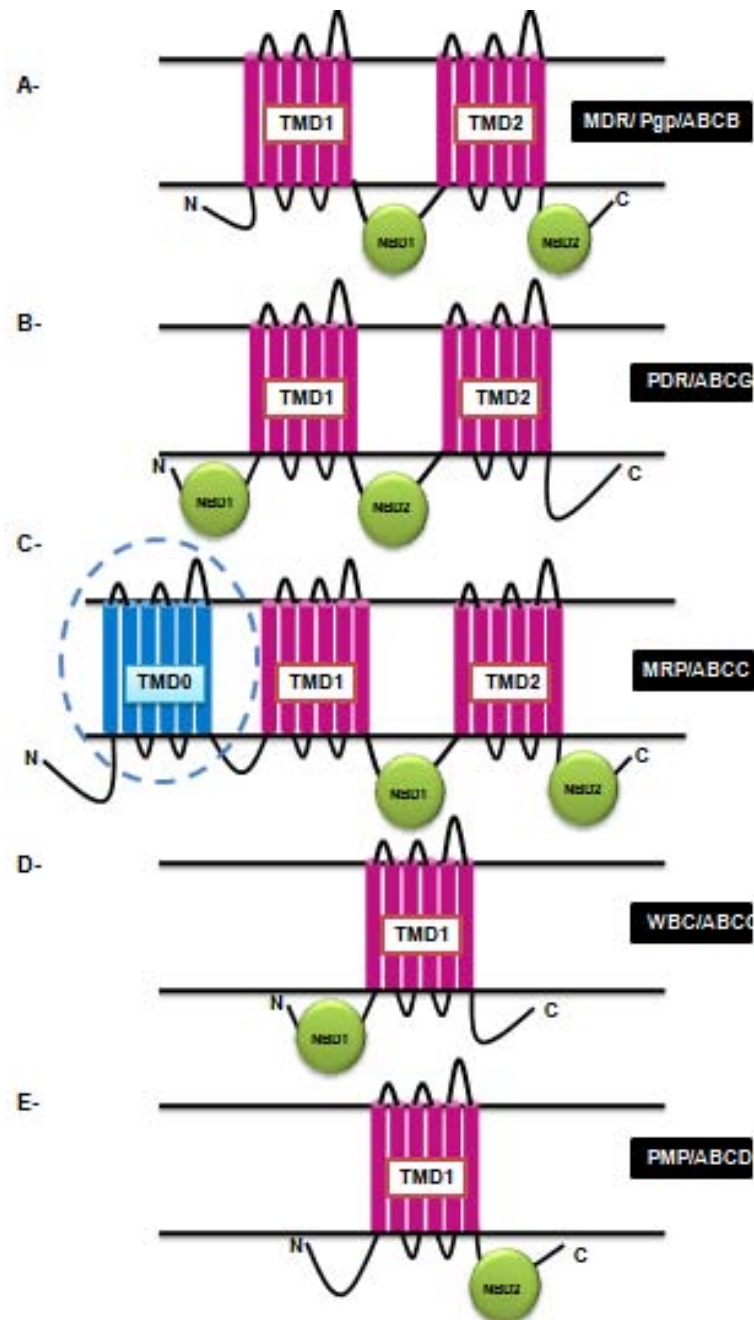


Figure 8: Arrangement des domaines structuraux caractéristiques des transporteurs ABC des principales sous-familles.

Les deux lignes horizontales délimitent la membrane biologique. La partie supérieure correspond au compartiment extérieur et la partie inférieure au compartiment intérieur. Le cercle en pointillé indique que TMD0 est facultatif chez certains MRP/ABCC (ex: CFTR). Les noms de protéines, ajoutés à côtés de chaque sous-famille, représentent des exemples d'après Sanchez-Fernandez *et al.* 2001.

5. Mécanisme du transport

De nombreuses études ont expliqué le mécanisme de transport des substrats par les transporteurs ABC, en effet les recherches ont débuté avec le modèle proposé par Bolhuis (Bolhuis *et al.* 1997) et se sont poursuivies par les mécanismes proposés par Locher (2004). Récemment et grâce aux progrès dans l'analyse structurale, un mécanisme général pour les transporteurs exportateurs a été proposé par Linton et Higgins (2007) et correspond au modèle de « l'aspirateur hydrophobe ». Ce modèle «ATP-switch model » décrit par Linton et Higgins implique des modifications conformationnelles et des corrélations dans les deux directions entre les domaines nucléotidiques et les domaines transmembranaires (Linton et Higgins, 2007). Le mécanisme ATP-switch comprend 4 étapes (figure 9) :

Au repos, le transporteur est dépourvu d'ATP et possède une forte affinité pour le ligand, ce dernier arrive par la bicouche phospholipidique (hydrophobe) et se lie au niveau des TMD, cette liaison entraîne un changement de conformation des NBD et augmente leur affinité pour l'ATP. La deuxième étape se caractérise par la fixation d'ATP au niveau des NBD qui sont sous conformation fermée, et engendre des changements de conformation dans les domaines transmembranaires induisant l'altération de leur affinité pour le ligand et permettant sa libération. L'hydrolyse de l'ATP déstabilise la conformation fermée du dimère et induit par la suite la dissociation du dimère des NBD. Martin et ses collaborateurs (2001) pensent que les changements conformationnels responsables de l'altération de l'affinité et de l'orientation du site de liaison du substrat sont dus à la liaison de l'ATP et non pas à son hydrolyse. La dernière étape consiste à la libération de l'ADP et du phosphate inorganique, provoquant ainsi des changements conformationnels, le retour de l'ABC à sa conformation ouverte et la restauration de l'état de haute affinité du transporteur pour le substrat afin d'initier un nouveau cycle (Sauna et Ambudkar, 2000). Le modèle décrit ci-dessus pourrait correspondre à un exportateur comme ABCB1, (Linton et Higgins, 2007). Les études spectroscopiques et chimiques ont montré que la liaison du substrat aux TMD induit des changements conformationnels au niveau des NBD d'ABCB1 (Liu et Sharom, 1996 ; Sonveaux *et al.* 1999), d'ABCB2/3 (Neumann *et al.* 2002), ABCC1 (Manciu *et al.* 2003) et HisP (transporteur d'histidine bactérienne) (Kreimer, 2000). La façon dont le site de liaison et d'hydrolyse de l'ATP sont choisis, est encore inconnue. Cependant, les deux NBD de BtuCD se font face ce qui implique une communication entre les deux domaines. Dans le cas des transporteurs ABC tels que ABCC8, ABCC7 ou ABCB2/3, un des deux NBD contient des

signatures dégénérées, ce qui suggère qu'un seul des deux NBD soit fonctionnel quant à l'hydrolyse d'ATP, et que l'autre possède des fonctions régulatrices (Lewis *et al.* 2004 ; Dawson *et al.* 2013). Il est probable qu'un mécanisme unique ne puisse pas décrire le cycle catalytique de tous les transporteurs ABC.

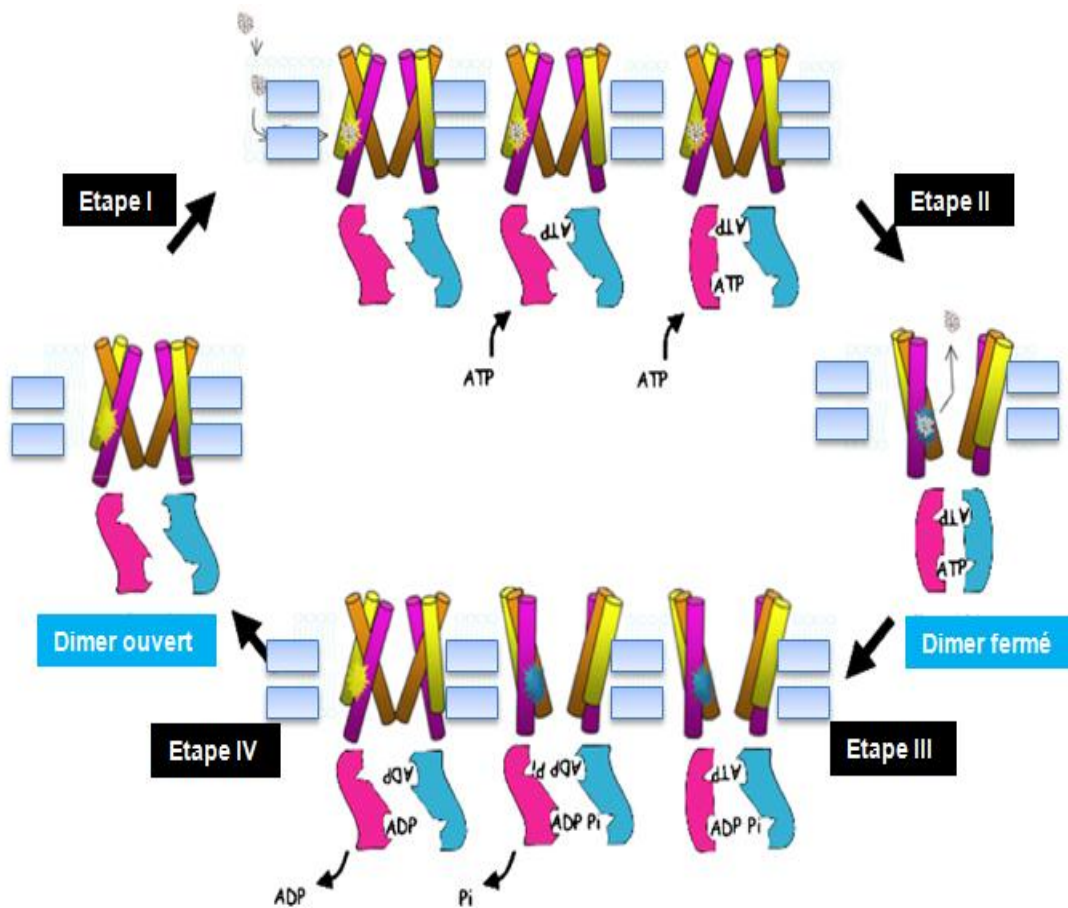


Figure 9: Modèle illustrant le transport dépendant de l'ATP des transporteurs ABC.

Les domaines transmembranaires sont représentés par des cylindres qui traversent la membrane et chaque domaine nucléotidique est représenté par une forme rose ou bleue dans le cytoplasme.

1ère étape: Fixation du substrat sur le domaine transmembranaire. L'affinité des NBD pour l'ATP est alors augmentée, induisant la formation d'un dimère dans une conformation fermée.

2ème étape: Le dimère formé induit un changement conformationnel des domaines TMD, de telle sorte à réduire leur affinité pour le substrat, libérant ainsi le substrat.

3ème et 4ème étape : L'hydrolyse de l'ATP déstabilise la configuration fermée du dimère et la libération de l'ADP et du phosphate inorganique restaure la configuration initiale du transporteur. D'après (Linton et Higgins, 2007).

6. Quelques pathologies associées au dysfonctionnement des protéines ABC

Les mutations au niveau des protéines ABC sont la cause de nombreuses pathologies et de ce fait font, depuis des décennies, sujets l'objet à de nombreuses études. En effet chez l'homme, le dysfonctionnement de gènes codant pour les protéines ABC est à l'origine de plusieurs maladies génétiques héréditaires associées à des pathologies variées (Langmann *et al.* 2003; Siest *et al.* 2005; Schmitz *et al.* 2006) ; à titre d'exemple : troubles hémorragiques (Albrecht *et al.* 2005; Oliveira *et al.* 2011), maladies des yeux (Martinez-Mir *et al.* 1998), maladies du foie (Jacquemin, 2000). Les mutations de certains gènes appartenant aux différentes sous-familles ABC, sont responsables de la maladie de Tangier (ABCA1) (Brooks-Wilson *et al.* 1999; Rust *et al.* 1999; Suetani *et al.* 2011), l'Alzheimer (ABCA2) (Mace *et al.* 2005), détresse respiratoire néonatale (ABCA3) (Shulenin *et al.* 2004), des désordres génétiques causant l'anémie sidérolastique (ABCB7) (Allikmets *et al.* 1999), la fibrose kystique/mucoviscidose (ABCC7) (Riordan *et al.* 1989; Gottesman *et al.* 2001; Oliveira *et al.* 2011; Smaczny *et al.* 2012). Au total, parmi les 48 ABC humains, 22 sont associés à des maladies (tableau 1).

7. Les transporteurs ABC chez les bactéries

Chez les bactéries, les transporteurs ABC sont impliqués dans la nutrition et l'adaptation à l'environnement. Ils catalysent l'importation de nombreux métabolites primaires, tels que les sucres, les acides aminés et les vitamines. Ils exportent également les antibiotiques, les lipides et les protéines telles que des protéases, des lipases (Kang *et al.* 2011). Le système de transport du maltose chez *E. coli*, est l'un des transports bactériens les plus étudiés (Mourez *et al.* 1997). Ce système renferme deux protéines membranaires intégrales 'MalG et MalF' formant les TMD, deux copies d'une sous unité ATPase 'MalK' formant les NBD, activant ainsi le processus de translocation et une protéine de liaison des substrats extracellulaire 'MalE' nécessaire à l'activité. La translocation du ligand et l'hydrolyse de l'ATP dépendent d'un mécanisme de signalisation provenant de la protéine de liaison et du déplacement à travers MalF/ MalG (Hunke *et al.* 2000).

D'autre part, chez *E. coli*, la protéine membranaire MsbA est une flippase appartenant à la superfamille des ABCs (Eckford *et al.* 2010). Les études fonctionnelles ont montré que MsbA est un transporteur poly-spécifique capable de reconnaître et de transporter un grand nombre de molécules médicamenteuses (Reuter *et al.* 2003 ; Shilling *et al.* 2006).

MsbA partage des identités de séquences significatives avec la protéine humaine « MDR1 » et « LmrA » de *Lactococcus lactis* qui sont impliquées dans la multirésistance médicamenteuse (Van Veen *et al.* 1998 ; Dean et Annilo, 2005 ; Ward *et al.* 2007). MsbA se trouve au niveau de la membrane des bactéries gram négatives, ou elle est supposée déplacer le lipide A de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane, une étape importante dans la voie de biosynthèse des lipopolysaccharides (King et Sharom, 2012).

Les études menées sur les transporteurs ABC bactériens tendent à décrire leurs fonctions physiologiques ou leurs caractères pathogéniques mais constituent aussi une source majeure de modèles structuraux permettant de comprendre le fonctionnement des transporteurs eucaryotes (Doshi et van Veen, 2013 ; Nakashima *et al.* 2013).

Gene	Synonyms	OMIM	Disorder or phenotype
ABCA1	ABC1	600046	Familial HDL deficiency Tangier disease
ABCA2	ABC2	600047	Alzheimer's disease
ABCA3	ABC3	601615	Neonatal surfactant deficiency
ABCA4	ABCR	601691	Retinopathies Macula degeneration Cone-rod dystrophy
ABCA7	ABC7	605414	Sjögren syndrome
ABCA12	ABC12	607800	Lamellar ichthyosis type II Harlequin ichthyosis
ABCB1	MDR1	171050	Ulcerative colitis
ABCB2	TAP1	170260	Immune deficiency
ABCB3	TAP2	170261	Wegener-like granulomatosis
ABCB4	MDR3	171060	Progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC-3) Intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP)
ABCB7	ABC7	300135	X-linked sideroblastosis and anemia (XLSA/A)
ABCB11	BSEP	603201	Progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC-2)
ABCC2	MRP2	601107	Dubin–Johnson syndrome (DJS)
ABCC6	MRP6	603234	Pseudoxanthoma elasticum (PXE)
ABCC7	CFTR	602421	Cystic fibrosis (CF)
ABCC8	SUR1	600509	Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy (PHHI)
ABCC9	SUR2	601439	Dilated cardiomyopathy with ventricular tachycardia
ABCD1	ALD	300371	Adrenoleukodystrophy (ALD)
ABCD3	PXMP1	170995	Zellweger syndrome 2 (ZWS2)
ABCG2	MXR, BCRP	603756	Protoporphyrin IX
ABCG5	White3	605459	β -Sitosterolemia
ABCG8	White 4	605460	β -Sitosterolemia

Tableau 1: Les transporteurs ABC humains et leurs maladies associées
(Schmitz *et al.* 2006).

8. Les transporteurs ABC humains

La chimiothérapie est une forme majeure du traitement de divers cancers depuis 1940 (revue par Mo et Zhang, 2012). Toutefois l'inefficacité et l'échec de cette thérapie est probablement due à la capacité des cellules cancéreuses à muter spontanément et d'acquérir une résistance à un agent unique (Mo et Zhang, 2012). D'autre part, la multirésistance médicamenteuse a montré que les cellules tumorales étaient en mesure d'expulser des médicaments anticancéreux (vinca-alcaloïdes, taxanes, dérivés d'anthracycline) presque à la même vitesse que leurs entrées. Ce phénomène dû à la surexpression des transporteurs ABC (Schinkel et Jonker, 2003 ; Wink *et al.* 2012) présents dans la plupart des cellules et des organismes et particulièrement actifs dans les épithéliums de l'intestin, le foie, les reins et l'endothélium (Twentyman et Bleehen 1991 ; You et Morris, 2007 ; Wink *et al.* 2012), est appelé *MultiDrug Resistance* : MDR (Gottesman, 2002). Chez l'homme, les 48 transporteurs ABC (Mo et Zhang, 2012) divisés en sept sous-familles allant de la sous famille A (ABCA) jusqu'à la sous famille G (ABCG) en fonction de leurs similitudes structurales et de leur homologies de séquences (tableau 2) (Dean, 2002; Zhang, 2007 ; Mo et Zhang, 2012; Piehler *et al.* 2012).

Le transporteur le plus connu de cette sous-famille est l'ABCC humain (MRP7, ABCC10) qui en dehors de son implication dans la résistance médicamenteuses, aucune activité biochimique ni fonctions physiologiques ne lui ont été attribuées (Chen *et al.* 2003). MRP7/ABCC10 humain assure le transport de très nombreux substrats qui peuvent être des substances physiologiques (peptides, hormones, sucres, ions...) ou encore des médicaments anticancéreux, des xénobiotiques et des leucotriènes (Chen *et al.* 2003 ; Hopper-Borge *et al.* 2004 ; Kruh *et al.* 2007 ; Rudin *et al.* 2011) (figure 10). Certains transporteurs ABCC sont impliqués dans les phénomènes de résistance multiple aux médicaments anticancéreux (MultiDrug Resistance) dont l'expression au niveau des cellules cancéreuses a été associée à une fonction de détoxification par efflux actif des médicaments, pouvant mettre en échec les chimiothérapies anticancéreuses (Leier *et al.* 1994 ; Leslie *et al.* 2001 ; Leslie *et al.* 2005 ; Dean, 2009).

Sous famille	Gènes	Synonymes	Locus
ABCA/ABC1	ABCA1	ABC1, TGD, HDLDT1, CERP	9q31.1
	ABCA2	ABC2	9q34
	ABCA3	ABC-C, ABC3	16p13.3
	ABCA4	ABCR, RP19, ABC10, FFM, STGD1, STGD,	1p22.1-p21
	ABCA5	ABC13	17q24.3
	ABCA7	ABCX, ABCA-SSN	19p13.3
	ABCA11	(pseudogène)	4p16.3
	ABCA13	-	7p12.3
ABCB/MDR	ABCB1	MDR1, P-gp, ABC20, GP170, PGY1	7q21.1
	ABCB2	TAP1, PSF1, RING4, ABC17, APT1, D6S114E	6p21.3
	ABCB3	TAP2, PSF2, RING11, D6S217E, ABC18	6p21.3
	ABCB4	PGY3, MDR2/3, MDR3, PFIC-3, ABC21	7q21.1
	ABCB6	ABC14, UMAT, MTABC3, PRP	2q36
	ABCB7	ABC7, ATM1P, ASAT	Xq12-q13
	ABCB8	M-ABC1	7q36
	ABCB9	TAPL	12q24
	ABCB10	M-ABC2, MTABC2	1q42
	ABCB11	BSEP, ABC16, PFIC-2, PFIC2, PGY4, SPGP	2q24
ABCC/MRP	ABCC1	MRP, MRP1, ABCC, ABC29, GS-X	16p13.1
	ABCC2	MRP2, CMOAT, ABC30	10q24
	ABCC3	MRP3, cMOAT2, MOAT-D, ABC31, MLP2	17q22
	ABCC4	MRP4, MOAT-B, MOATB,	13q32
	ABCC5	MRP5, ABC33, MOAT-C, MOATC, SMRP,	3q27
	ABCC6	MRP6, ABC34, ARA, MLP1, MOATE, PXE, PXE1	16p13.1
	ABCC7	CFTR, MRP7, CFTR/MRP, CF, ABC35, TNR-CF	7q31.2
	ABCC8	SUR1, SUR, MRP8, ABC36, HHF1, HI, HRINS,	11p15.1
	ABCC9	SUR2, ABC37, CMD10, FLJ36852	12p12.1
	ABCC10	MRP7	6p21.1
	ABCC11	MRP8	16q12.1
	ABCC12	MRP9	16q12.1
	ABCC13	PRED6 (pseudogène)	21q11.2
ABCD/ALD	ABCD1	ALD, ALDP, ABC42, AMN	Xq28
	ABCD2	ALDL1, ALDR, ABC39, ALDRP, Haldr	12q11-q12
	ABCD3	PXMP1, PMP70, ABCD/ALD ABC43	1p22-p21
	ABCD4	PXMP1L, P70R, ABC41, EST352188, P79R,	14q24.3
ABCE/OABP	ABCE1	RNASEL1, OABP, ABC38, RLI, RNASEL1, RNS4I	4q31
ABCF/GCN20	ABCF1	ABC50, ABC27	6p21.33
	ABCF2	ABC28, HUSSY-18, M-ABC1	7q36
ABCG/White	ABCG1	ABC8, WHITE1	21q22.3
	ABCG2	BCRP, BCRP1, MRX, MXR, MXR1, ABC15,	4q22
	ABCG4	WHITE2	11q23.3
	ABCG5	WHITE3, Sterolin1	2p21
	ABCG8	WHITE2, Sterolin2	2p21

**Tableau 2:la famille des transporteurs ABC chez l'homme
(D'après Dean et Annilo, 2005).**

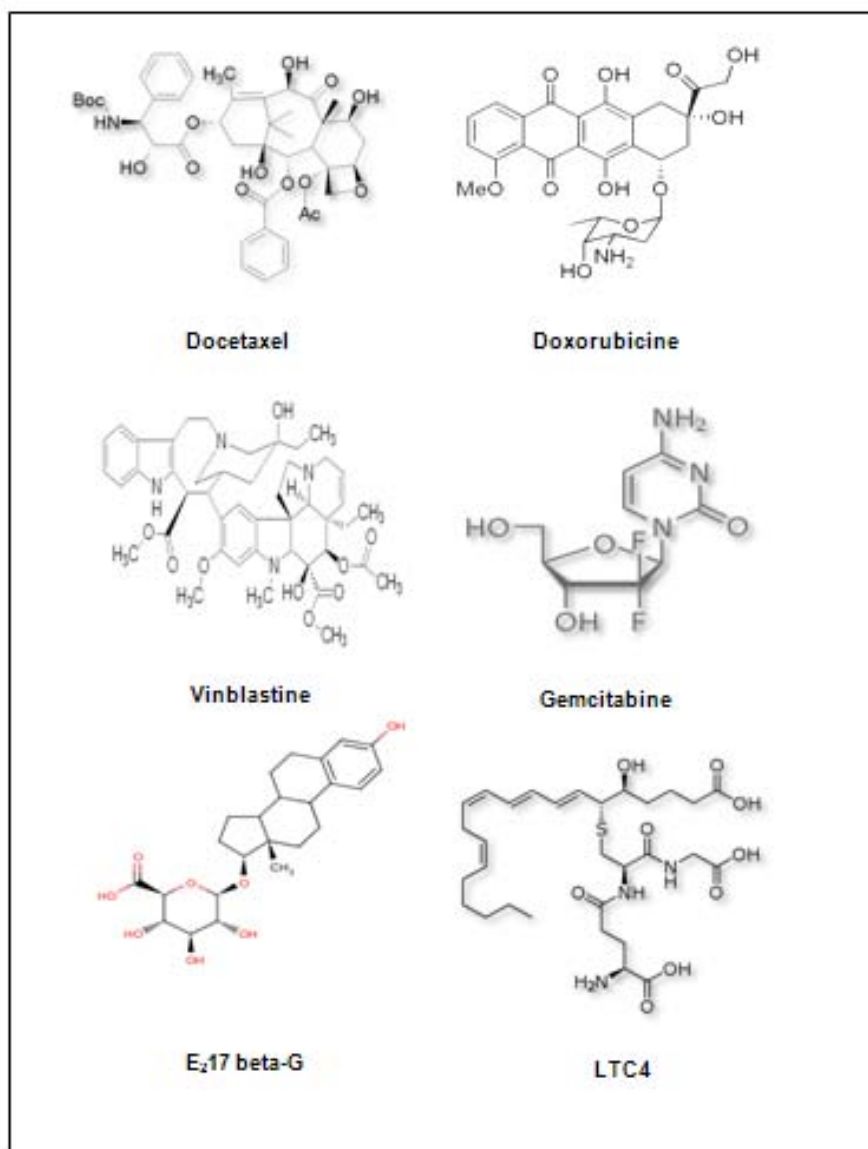


Figure 10: Les substrats d'ABCC10.

Docetaxel et vinblastine (Kuang *et al.* 2010). E₂17beta-G: 17Beta-estradiol-glucuronide (Gary *et al.* 2007). Doxorubicine (Hopper-Borge *et al.* 2004). Gemcitabine (Rudin *et al.* 2011). LTC₄: leucotriène C₄ (Chen *et al.* 2002).

Les transporteurs ABC humains sont exclusivement exportateurs et principalement impliqués dans l'efflux de composés endogènes tels que les produits métaboliques, les vitamines, les lipides et les stérols ainsi que des drogues exogènes et des toxines (tableau 3) (Mo et Zhang, 2012). Les trois types de transporteurs humains les mieux étudiés et qui ont été à l'origine de l'intérêt porté à l'étude des transporteurs ABC sont :

-ABCB1/MDR1/P-gp1 : est le premier transporteur ABC cloné. La protéine P-gp1 (*Poly glycoprotein 1*) est codée par le gène ABCB1 et présente la topologie classique des MDR/ABCB : TMD1-NBD1-TMD2-NBD2 (Wink *et al.* 2012). La protéine P-gp1 est une pompe à efflux dirigée vers la lumière intestinale. Elle pourrait être impliquée dans la biosynthèse (Liscovitch et Lavie, 2000) et le transport (Zager, 2001) du cholestérol. Par ailleurs, une large gamme d'agents chimiothérapeutiques lipophiles tels que les anthracènes, les anthracyclines, les épipodophyllotoxines, les taxanes et les vinca-alcaloïdes qui peuvent pénétrer dans les cellules tumorales par simple diffusion, sont des substrats de P-gp1 et peuvent être extrudés par le transporteur (Loo et Clarke, 2005 ; Wink *et al.* 2012). Enfin, les cellules surexprimant la protéine P-gp1, peuvent aussi montrer une résistance accrue aux infections virales (Raviv *et al.* 2000).

- ABCC1 : initialement appelé MRP puis MRP1. La protéine est codée par le gène ABCC1. Les transporteurs appartenant à la sous famille ABCC y compris ABCC1, ABCC7 et ABCC8, présentent un domaine très conservé qui est le NBD1 (Deeley et cole, 1997 ; Dean *et al.* 2001). ABCC1 transporte des médicaments conjugués au glutathion (GSH). Ce transporteur, similaire à ABCB1 du point de vue structure possède en plus, l'extension TMD0-CL0 N-terminale spécifique de la sous-famille ABCC. ABCC1 peut notamment expulser l'anthracénone, l'anthracycline, l'épipodophyllotoxine et les vinca-alcaloïdes (Wijnholds *et al.* 2000 ; Wink *et al.* 2012) ; les stéroïdes et les sels biliaires sont également des substrats physiologiques d'ABCC1 (Bakos *et al.* 2000). Ce transporteur est largement exprimé dans tout l'organisme surtout au niveau des poumons, des testicules, des reins, des muscles squelettiques, dans le placenta (Cole *et al.* 1992, Flens *et al.* 1996), dans le système circulatoire (Leslie *et al.* 2005), dans les lignées cancéreuses hépatiques (Roelofsen *et al.* 1997) et dans le plexus choroïde où il participe au filtre de la barrière cérébrospinale (Mercier *et al.* 2004).

- ABCG2 : la protéine BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*), codée par le gène ABCG2 est clonée pour la première fois par Doyle à partir d'une lignée cancéreuse de sein résistante à la chimiothérapie (Doyle *et al.* 1998). La structure de ce transporteur est différente de celle d'ABCB1 et d'ABCC1 puisqu'il possède un seul domaine transmembranaire et un seul domaine de liaison aux nucléotides, et fonctionne seulement après dimérisation. ABCG2 confère la résistance à la doxorubicine, la camptothécine et à la mitoxantrone (Krishnamurthy et Schuetz, 2006). Bien qu' ABCG2 semble jouer un rôle important dans le phénomène de résistance multi-drogue des cellules cancéreuses humaines, son expression et sa distribution

dans les tissus normaux montre son implication dans certaines fonctions physiologiques vitales telle que la protection de l'organisme contre les agressions environnementale en tant que première barrière de défense (Mo et Zhang, 2012). Ce transporteur est exprimé au niveau du placenta (Maliapaard *et al.* 2001), du foie, de l'intestin grêle (Allen *et al.* 1999), des villosités intestinales au niveau de la membrane apicale (Maliapaard *et al.* 2001 ; Jonker *et al.* 2002). ABCG2 est aussi exprimé dans les glandes mammaires où il est responsable de l'approvisionnement en vitamines du lait (biotine, riboflavine) (Vlaming *et al.* 2009). Aujourd'hui, la plupart des transporteurs ABC humains sont caractérisés soit par rapport à des maladies génétiques associées, soit à la résistance aux chimiothérapies, mais certains sont encore mal connus quant à leur fonction physiologique ou aux substrats qu'ils prennent en charge (par exemple ABCA13, ABCB5, ABCC10).

Agents									
Transporteur	DOX	DNR	VCR	VLB	ETOP	DOC	PAC	CPT11	SN38
MRP7	+	-	+	+	-	+	+	ns	-

Tableau 3: Produits aux quels MRP7 peut conférer une résistance.

(+) : > Cinq fois la résistance. (-) : ≤ Cinq fois la résistance. ns : non signalé. DOX: doxorubicine. DNR: daunorubicine. VCR: vincristine. VLB: vinblastine. ETOP: etoposide. DOC: docetaxel. PAC: paclitaxel. CPT11: irinotecan. SN38: molécule active de l'irinotecan. (Adapté d'après Gary *et al.* 2007).

9. Les transporteurs ABC chez les plantes

C'est dans le règne végétal que l'on trouve les plus grandes familles de protéines ABC (Sanchez-Fernandez *et al.* 2001). Chez les plantes, plusieurs transporteurs ABC ont été caractérisés, dans certains cas, leurs rôles physiologiques ont été identifiés. Cependant, la grande majorité reste non caractérisée. De nombreux transporteurs ABC ont fait l'objet d'études physiologiques approfondies et sont impliqués dans une grande variété de processus vitaux, développementaux et d'adaptation.

Arabidopsis thaliana est la plante modèle possédant le plus grand nombre de transporteurs ABC étudiés jusqu'à présent. Avec 131 membres, dont 54 transporteurs 'full size' (Sanchez-Fernandez *et al.* 2001 ; Martinoia *et al.* 2002), il est encore difficile de cerner la diversité des rôles de cette famille de transporteurs (Jasinski *et al.* 2003). En effet, en se basant sur leur structure en domaines et les relations phylogénétiques, les protéines ABC d'*Arabidopsis* sont actuellement classés en huit sous-familles (de ABCA à ABCH), en conformité avec le système de nomenclature pour les protéines ABC animales (Verrier *et al.* 2008 ; Wanke et Kolukisaoglu, 2010 ; Kang *et al.* 2011). Dans la sous-famille ABCA : AtABCA1 est un transporteur full-size (Verrier *et al.* 2008) contrairement aux 11 ABCA restant qui sont des transporteurs half-size, identifiés uniquement chez les plantes et les procaryotes (Peelman *et al.* 2003 ; Kovalchuk et Driessen, 2010). Le génome d'*Arabidopsis* code pour 21 'full-size' et sept 'half-size' ABCB (Vasiliou *et al.* 2009). Jusqu'à présent tous les ABCB full-size d'*Arabidopsis* sont localisés dans la membrane plasmique (Blakeslee *et al.* 2007 ; Rea, 2007 ; Lee *et al.* 2008). Trois transporteurs ABCB half-size également appelés ATM sont localisés dans les mitochondries (Rea, 2007). Des travaux récents ont montré qu'AtABCB26 (TAP1) est localisé dans le chloroplaste (Ferro *et al.* 2010), tandis qu'AtABCB27 (TAP2) est détecté, par une approche protéomique, dans la membrane vacuolaire (Jaquinod *et al.* 2007). Les protéines ABCB1, ABCB4 et ABCB19 sont impliquées dans le transport polaire d'auxines (Noh *et al.* 2001 ; Multani, *et al.* 2003 ; Geisler *et al.* 2005; Terasaka *et al.* 2005 ; Cho *et al.* 2007 ; Cho *et al.* 2012). La diversité fonctionnelle des transporteurs ABCB d'*Arabidopsis* se continue avec une étude qui décrit AtABCB14 comme étant un importateur de malate, depuis l'apoplaste au symplaste, capable de moduler la réponse stomatique au CO₂ (Lee *et al.* 2008).

Chez *Arabidopsis*, la sous famille ABCC est composée uniquement de transporteurs full-size. Les alignements de séquences et les profils d'hydrophobicité (TAIR10, <http://arabidopsis.org>), indiquent que tous les ABCCs présentent le domaine spécifique supplémentaire «TMD0» (Klein *et al.* 2006 ; Tusnady *et al.* 2006) dont la fonction est encore mal connue chez les plantes. La plupart des protéines appartenant à la sous-famille ABCC sont localisées au niveau de la membrane vacuolaire (Rea, 2007 ; Nagy *et al.* 2009) et ce sont les seuls ABC full size trouvés dans le tonoplaste d'*Arabidopsis thaliana* jusqu'à ce jour (Kang *et al.* 2011). Aujourd'hui, la séquence complète du génome d'*Arabidopsis* est disponible et on dénombre 15 membres appartenant à la sous famille ABCC (tableau 4) dont quatre (AtABCC1, 2, 11 et 12) sont groupés ensemble dans un même clade phylogénétique

(Frelet-Barrand *et al.* 2008). AtABCC2 mais pas AtABCC1, 11 et 12, est impliqué dans la dégradation de la chlorophylle ce qui suggère son implication dans le transport vacuolaire des catabolites chlorophylliens (Frelet-Barrand *et al.* 2008). En l'absence des deux transporteurs AtABCC1 et AtABCC2, *Arabidopsis thaliana* est extrêmement sensible à l'arsenic et aux herbicides à base d'arsenic. L'expression hétérologue de ces transporteurs chez *Saccharomyces cerevisiae*, modifiée pour produire des phytochélatines, a permis l'amélioration de la tolérance à ce composé toxique (Song *et al.* 2010). D'autre part, Klein *et al.* (2003-2004), ont montré que la régulation de l'ouverture des stomates et l'interaction avec l'environnement gazeux chez les plantes implique l'action coordonnée de deux transporteurs de la sous famille C (AtABCC4 et AtABCC5). Et malgré le rôle prépondérant d'AtABCC5 à conférer une insensibilité partielle à la sécheresse chez *Arabidopsis*, nous savons peu sur ses fonctions biochimiques. Cependant, l'expression hétérologue en levure, démontre qu'AtABCC5 code pour un transporteur de haute affinité à l'inositol hexakisphosphate (IP6) et qui est sensible aux inhibiteurs connus de transporteurs ABC (Nagy *et al.* 2009). D'autre membre de la sous famille ABCC, AtABCC3, AtABCC6, AtABCC7 sont orientés dans le même sens de transcription en quinconce sur le chromosome III, et appartiennent à un même clade impliqué dans la tolérance au cadmium (Gaillard *et al.* 2008).

La sous-famille ABCD est représentée par un transporteur half-size (ABCD2) et un transporteur full-size (ABCD1) situé au niveau des peroxysomes et impliqués dans la biosynthèse des acide gras (Hayashi *et al.* 2002, Kang *et al.* 2011).

Les protéines des sous-familles ABCE et ABCF consistent en trois et cinq membres respectivement et sont considérées comme étant solubles car-elles ne montrent aucun domaine transmembranaire. Elles fonctionnent probablement dans des processus autres que le transport comme c'est le cas de leurs orthologues humain et de levure qui participent au recyclage des ribosomes et au contrôle de la traduction (Pisare *et al.* 2010). Chez *Arabidopsis* la plus grande sous famille est celle des ABCGs qui comporte 28 WBC et 15 PDR (Verrier *et al.* 2008). Les gènes codant pour les protéines ABCG full size ont été uniquement identifiés chez les plantes, les champignons, les oomycètes, les algues brunes et les myxomycètes (Cock *et al.* 2010) et à l'exception d'AtABCG19 potentiellement au tonoplaste, tous les ABCGs sont localisés dans la membrane plasmique (Kang *et al.* 2010 ; Kuromori *et al.* 2010 ; McFarlane *et al.* 2010 ; Choi *et al.* 2011). Récemment, deux ABCG half-size et full-size ont été impliqués dans la signalisation à l'acide abscissique (ABA) : ABCG25 (Kuromori *et al.* 2010; Kang *et al.* 2011) chargerait l'ABA dans les vaisseaux conducteurs au niveau des racines et

ABCG40 (Kang *et al.* 2010 ; Kang *et al.* 2011) importerait l'ABA dans les cellules de garde des feuilles et assurerait l'adaptation à la sécheresse. Enfin, les ABCG half-size sont largement impliqués dans le dépôt des cires cuticulaires des feuilles (Samuels *et al.* 2008).

Protéine	I.G	Longueur	N° d'hélices	Topologie	L.S	Substrat
AtABCC1	At1g30400	1622	15	TMD0-(TMD-NBD)2	T, P	GS-X, folate
AtABCC2	At2g34660	1623	14	TMD0-(TMD-NBD)2	T	GS-X, chlorophylle catabolites
AtABCC3	At3g13080	1514	16	TMD0-(TMD-NBD)2	T	GS-X, chlorophylle catabolites
AtABCC4	At2g47800	1516	14	TMD0-(TMD-NBD)2	T, P	GS-X, folate
AtABCC5	At1g04120	1514	13	TMD0-(TMD-NBD)2	T, P	Inositol hexakisphosphate
AtABCC6	At3g13090	1466	14	TMD0-(TMD-NBD)2	T	-
AtABCC7	At3g13100	1493	16	TMD0-(TMD-NBD)2	T	-
AtABCC8	At3g21250	1294	10	TMD0-TMD2-NBD2	T	-
AtABCC9	At3g60160	1490	16	TMD0-(TMD-NBD)2	T	-
AtABCC10	At3g59140	1453	15	TMD0-(TMD-NBD)2	T	-
AtABCC11	At1g30420	1495	13	TMD0-(TMD-NBD)2	n d	-
AtABCC12	At1g30410	1465	14	TMD ?-(TMD-NBD)2	n d	-
AtABCC13	At2g07680	1251	9	TMD2-NBD2	n d	-
AtABCC14	At3g62700	1539	16	TMD0-(TMD-NBD)2	T	-
AtABCC15	At3g60970	pseudogene	-	-	n d	-

Tableau 4: Les gènes appartenant à la sous familles ABCC chez *Arabidopsis thaliana*.

Nomenclature actualisée à partir du site : ([http:// aramemnon. Botanik.uni-koeln.de](http://aramemnon.Botanik.uni-koeln.de)) concernant la longueur de la séquence protéique, le nombre d'hélice transmembranaires prédits et la topologie du transporteur. Non détecté (nd); tonoplaste (T, Jaquinod *et al.* 2007); membrane plasmique (P, Klein *et al.* 2006; Suh *et al.* 2007); information non significative (-). Les informations sur les substrats ABCC sont tirés à partir de : Lu *et al.* 1997; Raichaudhuri *et al.* 2009 (AtABCC1), Lu *et al.* 1998; Frelet-Barrand *et al.* 2008 (AtABCC2), Tommasini *et al.* 1998 (AtABCC3), Klein *et al.* 2004 (AtABCC4) and Nagy *et al.* 2009 (AtABCC5), I.G : identifiant du gene, L.S: localisation subcellulaire (d'après Wanke et Kolukisaoglu, 2010).

La sous famille ABCH qui ne contient que des transporteurs half-size est phylogénétiquement différente de la sous famille G et n'a pas été identifiée chez les plantes (Verrier *et al.* 2008 ; Kang *et al.* 2011).

Dans les autres espèces végétales, l'étude des transporteurs ABC est plus éparse. Toutefois, c'est chez le tabac que le premier transporteur ABCG/PDR a été fonctionnellement et physiologiquement caractérisé. Chez *Nicotiana plumbaginifolia*, le transporteur NpPDR1 secrète un diterpène antifongique produit par la plante (le sclaréol) au niveau des trichomes et participe ainsi à la mise en place d'une première barrière de défense contre les attaques pathogènes (Jasinski *et al.* 2001 ; Stukken *et al.* 2005). Citons aussi le transporteur ABC PDR1 de la famille ABCG chez *Petunia hybrida* qui fonctionne comme un exportateur cellulaire de strigolactone, molécule secrétée par les racines des plantes capables de stimuler fortement la croissance pré-symbiotique des champignons. En effet, PhPDR1 est le premier transporteur connu dans le transport de strigolactones, offrant de nouvelles possibilités d'étudier et de manipuler les processus strigolactones-dépendants (Kretzschmar *et al.* 2012). Chez *Coptis japonica*, CjMDR2 est un transporteur ABCB, préférentiellement exprimé dans le rhizome et impliqué dans le transport de la berbérine (Shitan *et al.* 2013), un alcaloïde végétal puissant montrant une forte cytotoxicité vis-à-vis des cellules de la plante qui ne la produisent pas, tandis que les cellules végétales de *Coptis japonica*, qui la produisent naturellement montrent une tolérance évidente pour cette molécule. Ce phénomène suggère l'existence d'un mécanisme de détoxification spécifique aux plantes produisant des alcaloïdes cytotoxiques (Sakai *et al.* 2002). Les transporteurs ABC sont connus pour exporter la vincristine et la vinblastine à partir de cellules cancéreuses humaines. Il a été récemment montré que ces transporteurs sont également impliqués dans le transport de divers alcaloïdes monoterpéniques dans les cellules de *C. roseus*. La surexpression d'un transporteur ABC dans cette plante pourrait donc affecter la régulation de la voie de biosynthèse des alcaloïdes. Par exemple, l'homologue CjMDR1 de CjMDR2, isolé à partir de *Coptis japonica*, a été exprimé dans des cultures cellulaires de *C. roseus*. Des expériences transport ont montré que les alcaloïdes endogènes, ajmalicine et tétrahydroalstonine ont été accumulés beaucoup plus dans les cellules de *C. roseus* exprimant CjMDR1 en comparaison avec les lignées contrôles (Pomahacová *et al.* 2009). Des études récentes ont également permis l'identification d'un transporteur de catharanthine chez *C. roseus*, CrTPT2 (famille PDR/ABCG). CrTPT2 est exprimé de façon prédominante dans l'épiderme des jeunes feuilles et le transporteur secrèterait cet alcaloïde à la surface des feuilles. L'extinction du gène dans la plante par la méthode du ViGS (*Virus-induced Gene Silencing*) montre une redistribution de la catharanthine dans la feuille favorisant l'augmentation du niveau des dimères catharanthine-vindoline dans les feuilles (Yu et De Luca, 2013).

Dans la présente étude, nous avons essayé d'identifier des transporteurs ABC présents en une seule copie et appartenant à la sous-famille ABCC chez *C. roseus* et *Arabidopsis thaliana*. L'originalité de cette étude est la présence d'un ABC humain *ABCC10* et de plante dans un même clade phylogénétique. À ce jour, aucune fonction physiologique n'a été attribuée à ces protéines, y compris l'orthologue humain qui a été caractérisé principalement par son implication dans la résistance aux médicaments anticancéreux (Chen *et al.* 2003; Hopper-Borge *et al.* 2004 ; Hopper-Borge *et al.* 2009). Cette étude pourrait être une piste intéressante mettant en évidence une possible fonction ancestrale commune.

Chapitre II : Matériels et méthodes

I. Matériels utilisés pour l'expérimentation

1. Les graines de Catharanthus roseus

Les plants de *C. roseus* ssp. *Pacifica Pink*, sont obtenus à partir de graines fournies par la société d'horticulture Ball Ducret (Thonon-Les-Bains, France). Elles sont mises à germer en terre. La culture des plants se fait sous serre au laboratoire EA 2106, dans des conditions précises. La température de l'air est entre 24 et 29°C pendant la journée et de 18°C la nuit. Les cycles d'éclairage sont de 16 heures lumière, suivis de 8 heures d'obscurité. Le sol est maintenu à un pH inférieur ou égal à 5.8 pour prévenir la chlorose des jeunes feuilles provoquée par une carence en fer.

2. La lignée cellulaire C20D de Catharanthus roseus

Cultivée au sein de l'équipe depuis 1989. Au cours de cette étude deux souches cellulaires de *C. roseus* ont été utilisées : une souche non chlorophyllienne, la souche C20D (C : *Catharanthus* ; 20 : poussant en milieu avec 20 g.L⁻¹ de saccharose ; D : 2,4-D dépendante) cultivée à l'obscurité, et une souche chlorophyllienne cultivée à la lumière (irradiance 18μE.m⁻².s⁻¹) sous une photo période de 12 heures. Les cellules utilisées sont issues de suspensions cellulaires de 50 mL, cultivées à une température constante de 25°C et sous agitation continue de 120 rpm, dans un milieu Gamborg B5, (Gamborg *et al.* 1968) contenant du saccharose (58 mM) et 4,5 μM de 2,4-D (milieu de maintenance des lignées cellulaires) à pH 5.5. La lignée est entretenue par repiquages hebdomadaires en diluant au 10^{ème} la suspension cellulaire âgée de 7 jours dans le milieu d'entretien (milieu +2,4-D : un analogue d'auxine). Les suspensions cellulaires C20D cultivées dans leur milieu d'entretien (+2,4-D) n'accumulent pas d'alcaloïdes. En effet, cultivées en absence de 2,4-D, ces cellules produisent certains AIM comme la serpentine ou l'ajmalicine (Arvy *et al.* 1994). Cette production peut être stimulée par l'ajout, au 3^{ème} jour de culture, de phytohormones comme la trans-zéatine (5 μM), le méthyl jasmonate (100 μM) et l'éthéphon (500 μM). Après chaque traitement, les fioles sont remises en agitation. Pour le dosage de l'ajmalicine, l'extraction des ARN et des protéines, les cellules sont récoltées par filtration sous vide sur toile à bluter, congelées dans l'azote liquide, et conservées à -80°C jusqu'au moment de leur utilisation.

3. Obtention des germinations de *Catharanthus roseus*

Pour l'obtention de germinations, les graines sont stérilisées par une incubation de 30 à 60 secondes dans l'éthanol 70%. Après trois rinçages à l'eau stérile, les graines sont incubées 24 heures dans l'eau, à température ambiante et à l'obscurité. Une cinquantaine de graines sont mises à germer par boîtes de Pétri (90 mm de diamètre) sur trois couches de papier Wattman imbibées d'eau stérile. Les boîtes sont ré-imbibées avec 1 ml d'eau stérile puis exposées 10-15 jours à la lumière en phytotron à 25°C. Les germinations sont alors prélevées puis directement congelées dans l'azote liquide.

4. Obtention des plants d'*Arabidopsis thaliana*

Les plants sauvages d'*Arabidopsis thaliana* (écotype Columbia, Col 0) ont été cultivés en chambre de culture à température constante de 22°C, et sous une photopériode de 16h lumière/8h obscurité à partir de graines semées directement en terre. Pour la croissance aseptique des plants, les graines d'*A. thaliana* ont été stérilisées par incubations dans une solution d'eau de javel 20% Triton X-100 à 0.7% pendant 15 min, suivie par quatre rinçages à l'eau stérile et ensuite conservées dans l'agar 0.1%. La dormance des graines a été levée par un passage à 4°C et à l'obscurité pendant 4 jours, suite auquel les graines sont mises à germer soit sur des boîtes contenant du milieu MS solide (0.5x).

II. Méthodes

1. Méthodes de microbiologie

1.1. Milieux de culture et antibiotiques

1.1.1. Milieu LB High salt pour *Escherichia coli*

Les bactéries *E. coli* (souche TOP10F') sont cultivées dans du milieu LB (Luria Bertani) « High salt » liquide contenant 1% (p/v) Tryptone (Duchefa Biochimie), 0.5% (p/v) Bacto™ Yeast Extract (Duchefa Biochimie) et 1% (p/v) NaCl (Fisher). Pour obtenir un milieu solide, le LB est complété par 1.5% (p/v) d'agar HP 696 (Kalys). Après stérilisation à l'autoclave, les antibiotiques, thermolabiles, sont ajoutés lorsque la température du milieu atteint 50°C à savoir la Kanamycine : 50 µg.mL⁻¹ et Ampicilline : 100 µg.mL⁻¹. Puis les boîtes

de pétri sont coulées et laissées sécher 45 minutes avant de les stocker à 4°C. Les milieux solides en boîtes de Pétri sont coulés avec environ 20 à 25 mL par boîte.

1.1.2. Milieu 2YT pour *Agrobacterium tumefaciens*

Les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* sont cultivées dans du milieu 2YT liquide contenant pour un litre, 16 g Tryptone, 10 g d'extrait de levure et 5 g NaCl. Pour obtenir du milieu solide, 15 g d'agar HP 696 (Kalys) sont ajoutés. Pour la sélection des boîtes RGK : ont été utilisées : Rifampicine (20 mg/mL), Gentamicine (40 mg/mL), Kanamycine (100mg/mL).

1.2. Préparation des bactéries (*E. coli*)

1.2.1. Préparation des bactéries *E. coli* électro-compétentes

Une pré-culture bactérienne d'*E. coli* de 5 mL de LB liquide lancée la veille à partir d'une colonie isolée est utilisée pour ensemer 250 mL de LB préchauffé à 37°C. La culture est mise sous agitation à 37°C/300 rpm, jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance. Cet état est atteint lorsque la densité optique à 600 nm de la culture diluée 10 fois est comprise entre (0.5 et 0.7). A la DO désirée la culture bactérienne est placée 20 minutes dans la glace pour stopper la multiplication cellulaire. Ensuite, toutes les étapes se déroulent à 4°C avec des solutions stériles. Après une centrifugation de 10 min à 3000 g (centrifugeuse Sigma 3K18 Bioblock Scientific), le surnageant est éliminé et les culots de bactéries sont suspendus dans 50 mL d'eau glacée puis rincés trois fois à l'eau glacée et une fois dans du glycérol 10% glacé par des cycles de centrifugation/re-suspension. Le dernier culot est repris dans 1,5 mL de glycérol 10%. Les bactéries sont aliquotées par 40 µL en tubes Eppendorf (1,7 mL), puis immédiatement congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C.

- *Transformation par électroporation*

Avant l'électroporation et afin d'éliminer les sels, les produits de ligation sont dialysés 10 minutes sur des filtres de nitrocellulose (Millipore : 0.025 µM) maintenus en suspension sur l'eau. La ligation dialysée est ajoutée à un aliquot de bactéries compétentes de 40 µL décongelé 5 minutes sur la glace. Les bactéries sont alors transformées par choc électrique (MicroPulseur, Biorad, Mode "Eco1") et immédiatement diluées dans 1mL de milieu LB ou milieu «SOC». Après une heure d'incubation à 37°C, les bactéries sont culottées par deux minutes de centrifugation à 6000 g (centrifugeuse Sigma 2-16 Bioblock Scientific). Le culot

bactérien est étalé sur du LB solide, en boîte de Pétri, contenant l'antibiotique adéquat. Les boîtes sont placées 16 h à 37°C.

1.2.2. Préparation des bactéries (*E. coli*) thermocompétentes : Top 10F'

Le culot de cellules en phase exponentielle de croissance obtenu comme décrit au paragraphe 1.2.1 est suspendu délicatement dans 50 mL de CaCl₂ (50 mM) puis incubé 30 min dans la glace. Après centrifugation pendant 10 min à 4°C à 2000 *g*, le culot est suspendu dans 2 mL d'une solution glacée de CaCl₂ (50 mM)/glycérol 20%. Les cellules sont aliquotées par 50 µL, immédiatement congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C.

- *Transformation par choc thermique*

Les bactéries thermocompétentes décongelées sont incubées 10 minutes dans la glace avec le plasmide, puis placées 45 secondes à 42°C (choque thermique) et immédiatement replacées dans la glace pendant 5 minutes. Les cellules sont alors suspendues dans 1 mL de milieu LB ou de milieu SOC, puis incubées une heure à 37°C. Les bactéries sont ensuite étalées et incubées comme décrit précédemment.

-Composition du milieu SOC (100 mL).

-2 g tryptone

-0.5 g extrait de levure

-1 mL NaCl (1 M)

-0.25 mL KCl (1 M)

-1 mL Mg²⁺ (2 M)

-1 mL glucose

1.3. Extraction d'ADN plasmidique à partir des cultures *E.coli*

Le but est d'extraire l'ADN plasmidique sans l'ADN génomique des cultures bactériennes afin de l'analyser avec des enzymes de restriction sur un gel d'agarose. Pour cela il existe différentes manières d'extractions dont les protocoles sont les suivants :

1.3.1. Mini-préparation d'ADN plasmidique au TENS

Une culture bactérienne d'une nuit (1.5 à 2 mL) est transférée en microtube et les bactéries sont culottées par deux minutes de centrifugation à 3000 *g*. Le surnageant est éliminé et le culot bactérien suspendu au vortex dans 75 µL de tampon GTE (Glucose 1% (p/v), Tris-HCL 25 mM, Na₂EDTA 10 mM, pH 8.0). Pour la suite, entre les différentes étapes, les échantillons sont gardés sur la glace. Les deux étapes suivantes sont réalisées en couplant les échantillons

par deux pour ne pas faire une lyse alcaline trop longue. Ensuite sont ajoutés 300 µL de tampon TENS (tableau 5) : (Tris-HCL 10 mM, Na₂EDTA 1 mM, pH 8.0 supplémenté de NaOH 0.1 N et de SDS 0.5%), agité au vortex 10 secondes. Immédiatement après, sont ajoutés 150µL d'acétate de sodium 3 M, pH 5.2. Après une centrifugation de 20 minutes à 18000 *g* à 4°C (centrifugeuse Sigma 2K15 Bioblock Scientific), le surnageant est délicatement transféré dans un tube Eppendorf neuf et 900 µL d'éthanol 100% glacé sont ajoutés. Après homogénéisation par renversement, l'ADN est précipité 10 min à (-20°C) puis culotté par 10 minutes de centrifugation à 18000 *g* à 4°C. Le culot plasmidique obtenu est lavé par 1 mL d'éthanol 70% et séché cinq minutes au speedvac (DNA SpeedVac® DNA110 Savant). Le culot est suspendu, au moins 15 minutes, à température ambiante dans 70µL d'eau contenant 1µL de RNase A à 1 mg.mL⁻¹.

	1 mL	2.5 mL	5 mL	10 mL	20 mL
TE Buffer	0.94 mL	2.35 mL	4.7 mL	9.4 mL	18.8 mL
Na OH 10N	10 µL	25 µL	50 µL	100 µL	200 µL
SDS %	50 µL	125 µL	250 µL	500 µL	1000 µL
Mini-préparations	3	8	16	32	64

Tableau 5:Composition du tampon TENS.

1.3.2. Utilisation d'un kit commercial

L'utilisation de kits commerciaux permet l'obtention rapide d'un ADN plasmidique propre issu d'une culture bactérienne de 2 à 5 mL mais sont plus onéreux qu'une extraction artisanale « de laboratoire ». Ils seront donc réservés pour des procédures nécessitant un ADN propre telles que les réactions de séquençage ou les transfections de protoplastes. Deux kits, qui reposent sur le même principe, ont été testés (QIAprep® Spin Miniprep de Qiagen et NucleoSpin® Plasmid de Macherey-Nagel).

Pratiquement l'utilisation du kit consiste en un premier lieu à culotter une culture bactérienne de 2-5 mL, puis les bactéries sont suspendues afin d'être lysées dans une solution contenant des sels chaotropiques (isothiocyanate de guanidine), qui assurent une dénaturation complète des macromolécules, et un détergent pour la solubilisation des membranes biologiques. Un autre tampon est ajouté pour faire précipiter les débris cellulaires, les protéines et l'ADN génomique. Le tube est centrifugé pour culotter les débris et récupérer le

surnaissant contenant l'ADN qui va être filtré sur une colonne à forte affinité pour l'ADN. La colonne est lavée avec un tampon afin d'éliminer les sels et les macromolécules restantes pour obtenir un ADN propre. Le tube subit deux centrifugations afin d'éliminer les résidus d'éthanol utilisé pour favoriser la liaison de l'ADN à une colonne de silice pour micro-centrifugeuse sur laquelle le lysat est chargé. Après deux étapes de lavage, l'ADN est élué de la colonne par 40-60 μL d'eau ou de tampon d'éluion (TE). Cette procédure ne nécessite que quelques minutes.

1.4. PCR directe sur colonie bactérienne

Ce test rapide permet de réaliser une PCR sur de l'ADN bactérien/plasmidique sans étape de purification d'ADN puisque la colonie est directement utilisée. L'ADN utilisé pour la PCR est prélevé en piquant une colonie avec une pointe (côneun pipetman). Les bactéries sont libérées en tournant le cône 5-6 fois dans un tube PCR contenant 15 μL de mélange réactionnel PCR. Lorsque les bactéries sont prélevées sur des colonies isolées obtenues après transformation, le même cône sert pour le repiquage. Les conditions PCR sont standards mais la première étape de dénaturation de l'ADN, habituellement de 3-5 minutes à 92-96°C, est de 10 minutes à 95°C de façon à améliorer la lyse bactérienne et libérer l'ADN avant d'entamer les cycles d'amplification. Le résultat de la PCR est analysé par une électrophorèse sur gel d'agarose standard.

2. Méthodes de biologie Moléculaire

2.1. Méthodes d'extraction des acides nucléiques de plantes

2.1.1. Extraction d'ADN génomique (ADNg) de *C. roseus*

L'ADNg total est extrait des feuilles de *C. roseus* en utilisant un kit commercial « DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen) » qui permet l'obtention rapide d'un ADN propre. Les feuilles récoltées (100 mg) sont immédiatement congelées dans l'azote liquide puis broyées jusqu'à obtention d'une poudre fine. Au broyat congelé, transféré dans un microtube de 2 mL, est ajouté une série de tampon d'extraction selon les instructions du fabricant. La dernière étape consiste à placer la colonne de NucleoSpinR dans un tube eppendorf, ensuite on ajoute au centre, 100 μL de tampon d'éluion (CE) déjà préchauffé à 70°C. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante on centrifuge 1min à 11000 *g*. La concentration en ADN est mesurée par lecture de la DO à 260 nm (1 unité DO= 50 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$) sur un

spectrophotomètre "DU® 640B-Spectrophotometer BECKMAN" d'une dilution au centième de l'échantillon dans du CE.

2.1.2. Préparation d'ARN de plante : kit commercial (Qiagen)

L'ARN total est extrait à partir de différents organes de *C. roseus* selon le protocole du kit Qiagen "RNeasy® Plant Mini Kit". Cette extraction repose sur le même principe que la purification d'ADN plasmidique mais adapté pour les ARN : il s'agit de l'adsorption des acides nucléiques sur colonne de silice en présence de sels chaotropiques et d'éthanol. Brièvement, le matériel végétal récolté est immédiatement congelé dans l'azote liquide puis broyé jusqu'à obtention d'une poudre fine sur laquelle est ajouté le tampon de lyse contenant les sels chaotropiques. Après passage sur une première colonne, le filtrat est chargé sur une deuxième colonne équipée d'une matrice de silice sur laquelle se fixent les acides nucléiques. Après traitement à la DNaseI et lavages, l'ARN est élué par 40 à 50 µL d'eau *RNase free* (fournie dans le kit). La concentration en ARN est mesurée par lecture de la DO à 260 nm (1 unité DO = 40 µg.µL⁻¹) sur un spectrophotomètre "DU® 640B-Spectrophotometer BECKMAN".

2.1.3. Extraction d'ADN génomique par CTAB

Ce protocole d'extraction permet d'obtenir rapidement de l'ADN génomique de plante, en quantité et qualité suffisantes pour de l'analyse en PCR. Il permet de travailler avec un grand nombre d'échantillons et sera utilisé notamment pour le génotypage des plantes.

Les germinations (1 seule suffit) de 6 jours d'*A. thaliana* ou l'équivalent d'un disque foliaire de 7 mm sont broyées à l'aide d'un piston électrique dans un tube Eppendorf de 1.7 mL contenant 400 µL de tampon d'extraction CTAB (tableau 6) aux quels sont ajoutés 4 µL de β-mercapto-éthanol et environ 50 µL de sable fin. Le broyat est incubé pendant 15 min à 60°C, ensuite les tubes sont placés dans la glace pendant 5 minutes. Une centrifugation de 10 min à 4°C et 18000 *g* est effectuée et suite à laquelle le surnageant est récupéré délicatement. Ensuite deux volumes d'éthanol 100% sont ajoutés, les tubes sont remués et précipités 20 min à -20°C puis de nouveau centrifugés 10 min à 4°C à 18000 *g*. Le culot est lavé deux fois par 600 µL d'éthanol 70%, séché 15-20 min à température ambiante puis suspendu dans 100 µL d'H₂O. La qualité de l'ADN obtenue ici ne permet pas un dosage fiable au spectrophotomètre.

	50 ml	100ml	200ml	250ml
100 mM tris (stock 1M)	5ml	10ml	20ml	25ml
1.4 M NaCl (stock 2.5M)	28ml	56ml	112ml	140ml
20 mM EDTA (stock 0.5M)	2ml	4ml	18ml	10ml
2% (W/V) CTAB	1g	2g	4g	5g
2% (W/V) PVP-40	1g	2g	4g	5g
H ₂ O	qsp 50ml	qsp 100ml	qsp 200ml	qsp 250ml
		Autoclave		
2%(V/V) β-mercaptoéthanol	1ml	2ml	4ml	5ml

Tableau 6: Tampon d'extraction CTAB.

2.2. Electrophorèse des acides nucléiques

2.2.1. Electrophorèse en gel d'agarose TAE

L'ADN est analysé sur gel d'agarose dans un tampon TAE, préparé à partir d'une solution stock de TAE 50 fois concentrée : Tris 400 mM, acétate de sodium 200 mM, Na-EDTA 20 mM, pH 8. 0 (acide acétique glacial). La concentration en agarose varie de 0.5 à 2% en fonction de la taille des fragments d'ADN à séparer. Avant de couler le gel, 1 µL d'une solution de bromure d'ethidium à 250 µg/mL est ajouté par mL de gel. Les échantillons sont complétés par 10% (v/v) de tampon de charge (bleu de bromophénol 0. 25%, xylène cyanol 0. 25%; glycérol 50%). La migration s'effectue à 100 volts pendant 30 à 40 minutes. L'ADN est visualisé sur un banc UV.

Rq. : Les produits de PCR réalisées avec la GoTaq (Promega) sont directement chargés sur le gel puisque le mélange réactionnel contient déjà le tampon de charge.

2.2.2. Purification de fragment d'ADN d'un gel d'agarose électrophorétique TAE

Après migration des échantillons d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose, les bandes d'intérêt sont découpées sur banc UV et l'ADN est extrait du gel avec le kit « Nucleospin extract II » (Marcherey Nagel) en suivant les instructions du fabricant. Ce kit est aussi utilisé pour purifier des échantillons d'ADN issus de réactions enzymatiques de type transcription reverse, digestion par enzymes de restriction, terminal transférase ou PCR.

2.3. La réaction de polymérisation en chaîne : PCR (Polymerase Chain Reaction)

2.3.1. Principe de la réaction en chaîne de polymérase (PCR)

La PCR, ou réaction de polymérisation en chaîne, est une technique permettant d'amplifier des séquences d'acides nucléiques, à l'aide d'un thermocycleur. Elle repose sur les propriétés de polymérases à ADN résistant à haute température, qui assure la duplication de l'ADN. Un cycle PCR comprend une dénaturation de l'ADN, une hybridation d'amorces et une élongation, réalisée par généralement par une Taq (*Thermus aquaticus*) polymérase. Les produits de chaque étape de synthèse sont utilisés comme matrice pour les étapes suivantes, l'amplification d'ADN est exponentielle. La dénaturation des doubles brins d'ADN s'effectue à 95°C afin de permettre la fixation des amorces. La température d'hybridation des amorces sur l'ADN simple brin ainsi obtenu est variable et fonction du pourcentage en bases GC des amorces ($T_f = 2(A+T) + 4(G+C)$). Il est néanmoins souvent nécessaire de réajuster cette température (généralement comprise entre 50°C et 60°C) afin d'obtenir une meilleure spécificité d'hybridation. La polymérase est alors en mesure de se fixer sur les amorces et d'en assurer l'extension. Cette élongation se fait à 72°C pendant un temps qui est fonction de la longueur de l'ADN (généralement 1 kb/min pour l'enzyme GoTaq polymérase de Promega). Ce cycle se répète en moyenne une trentaine de fois. La liste des amorces utilisées est présentée dans le tableau 7.

Nom	Séquence (→3')	Tm (°C) - Taille
3) – Tai	GGACATTGAGGTAAAAGAATCCGG	62,86TTGAGGTAAu
32,86TTG	GACATCATTCTCTGTTGGACAACG	62,86CATTCTCTG
52,86CAT	CTGCACATAGGAGAGAACTATAGCAATCC	66,04CATAGGAGAG
56,04CAT	TAGCAATCCCAAGAGGCCG	64,50ATCCCAAGA
CrMRP1AF	TGCTATAGTTCTCTCTATGTGC	60,99TAGTTCTCTC
CrMRP1AR	GAATGCCCTAATAGATGATGCTCC	62,86CCCTAATAGA
MRP1RACE1R	CAAACTCAGACAGTCATTAATCACC	61,4ACTCAGACAGTC
MRP1RACE2R	CAGTCATTAATCACCTTTAAAGACC	59,9°C - 26 Nu
MRP1RACE3R	GACACGAATGCTCCAAGAGCAGGC	68CACGAATGCTCCAAG
MRP1RACE4R	CACAGTGAACAGCAGAATCTTTGC	62,9°C - 24 Nu
MRP2F	CTCTNCCGTTTATNCTCAACAT	58,94CCGTTTATNC
MRP4R	GCNGTGCAATCATCAAGGC	61,24GCATTCATCA
MRP8F	TATGGATGGNCNTAYTTSCGT	59,64ATGGNCNTAY
oligo-dG	GGGGGGGGGGGGGGGGGGH	76,6 °C - 18 Nu

Tableau 7: liste des principales amorces utilisées pour l'obtention des séquences initiales de CrABCC1.

2.3.2. Procédure expérimentale de la PCR

Deux différentes polymérases à ADN ont été utilisées :

-GoTaq® Flexi DNA Polymérase (Promega) et ses tampons sont utilisés pour les PCR courantes. Le mélange réactionnel *GoTaq* contient déjà du tampon de charge et présente l'avantage de pouvoir être directement chargé sur gel d'électrophorèse sans addition de tampon de charge. Par ailleurs, l'enzyme possède une activité terminale transférase qui ajoute une désoxyadénosine (dATP) aux extrémités 3' des fragments amplifiés. Ce dATP est utilisé pour le clonage des produits PCR par *TA-cloning*.

Mélange réactionnel PCR GoTaq® :

- ADN : 5-50 ng (selon ADNc, ADNg ou ADN plasmidique)
- Amorce sens : 0.4 μ M
- Amorce anti-sens : 0.4 μ M
- Mix dNTP : 0.4 mM
- Tampon 5x Green GoTaq® (contenant le tampon de charge) : x 1
- MgCl₂ 25 mM : 2 mM
- GoTaq® Flexi DNA Polymérase : 0.05 U par μ L de PCR
- H₂O qsp 50 μ L, 25 μ L ou 15 μ L (volume final de la PCR)

Conditions PCR GoTaq® :

Cycles	Températures	Temps	
1	94°C	3 min	Dénaturation initiale
30	94°C	30 sec	Dénaturation
	Tm - 10 °C	30sec	Hybridation des amorces
	72°C	1 min	Elongation (1 min par kb de produit amplifié)
1	72°C	5 min	Elongation finale.
1	4°C	∞	

-La Platinum® Pfu (*Pyrococcus furiosus*) DNA Polymérase (Invitrogen) et ses tampons sont utilisés pour des PCR nécessitant une activité enzymatique à haute-fidélité, l'enzyme introduit moins de mutations qu'une polymérase standard. Elle est recommandée pour les PCR destinées à l'expression protéique. Cependant, les produits PCR obtenus avec la *polymérase Pfu* ne possèdent pas de déoxyadénosine additionnelle en 3' et ne peuvent donc pas être directement clonés par *TA-cloning*. Une étape supplémentaire d'A-tailing est donc nécessaire.

Mélange réactionnel PCR haute-fidélité polymérase Pfu :

- ADN : 5-50 ng
- Amorce sens : 0.4 μ M
- Amorce anti-sens : 0.4 μ M
- Mix dNTP : 0.4 mM
- Tampon *Pfx* amplification 10x : x 1
- MgSO₄ 50 mM : 1 mM
- Platinum® *Pfu* DNA Polymerase : 1.25 U
- Solution *PCR Enhancer* 10x : x 1
- H₂O qsp 25 μ L

2.3.3. PCR emboîtée (nested-PCR)

Cette méthode consiste à réaliser deux PCR successives, chacune avec un jeu d'amorces : l'ADN amplifié lors de la première PCR est utilisé comme matrice pour la deuxième PCR avec deux amorces internes, dites "emboîtées", au premier jeu d'amorces. La PCR emboîtée permet d'amplifier des ADN très peu représentés en conservant une grande spécificité (1 μ L de PCR1 suffit comme matrice pour la PCR2). La PCR devient "semi-emboîtée" quand seulement une des deux amorces de la deuxième PCR (sens ou anti sens) est emboîtée par rapport à celles de la première PCR.

2.3.4. PCR semi-quantitative

Au cours d'une PCR, les produits d'amplification évoluent de façon exponentielle avant d'atteindre un plateau. Pendant la phase exponentielle, la quantité d'ADN synthétisée est proportionnelle à la quantité d'ADN de départ. La PCR semi-quantitative consiste à analyser des produits d'amplification PCR aux nombres de cycles croissants (exemple de cycles : 24, 26, 28, 30), de façon à se placer en phase exponentielle, avant le plateau d'amplification. Cette méthode rapide et sensible, permet de comparer les niveaux d'expression des transcrits de gènes cibles. Pratiquement, un mix PCR global pour un transcrit à tester est préparé et reparti dans les tubes PCR qui seront prélevés à différents cycles pendant la PCR. Les quantités d'ADN amplifié peuvent être évaluées en gel d'agarose.

2.4. Modification et analyse des acides nucléiques

2.4.1. Digestion par les enzymes de restriction.

Différents enzymes de restriction ont été utilisés. Chaque enzyme possède son tampon réactionnel fourni par le distributeur (Promega ou invitrogen). Les plasmides purifiés sont digérés par des enzymes de restriction afin de vérifier que le fragment d'ADN soit bien inséré dans le vecteur et pour estimer la taille de l'ADN recombinant. Celui-ci a été inséré dans un site multiple de clonage contenant divers sites de restriction. Si le résultat est positif, on réalise une digestion par une autre enzyme afin d'extraire notre fragment du vecteur pour pouvoir le sous cloner dans un vecteur d'expression de plante en fusion avec des molécules fluorescentes à savoir l'YFP et la GFP, si le résultat est négatif, il faut relancer une transformation. Dans certains cas, le sens de l'orientation de l'insert dans le vecteur peut être aussi déterminé. Généralement la digestion est réalisée sur des plasmides purifiés (environ 5 µg) auxquels sont ajoutés 1 µL d'enzyme, 2 µL de tampon de digestion dans un volume final de 15 µL. Le tube est placé dans un bain marie à 37°C pour une incubation d'environ 3h. Les produits de digestion (15 µL) additionné à un tampon de charge (2 µL), sont déposés dans les puits d'un gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium (BET). Le BET permet de visualiser les fragments d'ADN sous UV et d'estimer leur taille par comparaison avec celles d'un marqueur de taille (« Smart Ladder » de Promega).

Par exemple, pour un profil de restriction *EcoRI* (Promega) d'un ADN issu d'une mini-préparation plasmidique au TENS, la réaction est la suivante :

- ADN plasmidique 7 µL
- Tampon H 10x 1.5 µL
- EcoRI* (12 unités/µl) 1 µL
- H₂O qsp 15 µl 5.5 µL
- Incubation 3-4 heures à 37°C

2.4.2. Rétro-transcription d'ARN en ADN complémentaire (ADNc)

La reverse transcriptase (RT) est une ADN polymérase ARN-dépendante. A partir d'une amorce oligo-dt ou d'une amorce spécifique d'un gène cette enzyme retro-transcrit l'ARN en ADN. L'ADN simple brin synthétisé ayant une séquence en inverse-complément de l'ARN matrice est appelé ADN complémentaire (ADNc).

Procédures expérimentales :

- M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverse transcriptase :

ARN (5-10 µg) *n* µL

Oligo-dT (100 µM)

H₂O qsp 16 µL

10 min à 75°C (dénaturation) puis 5 min dans la glace

RNaseOUT (inhibiteur de RNase) 1 µL

dNTP (10 mM) 1 µL

Tampon M-MLV 5x 5 µL

M-MLV RT (200 unités/µl) 1 µL

1 heure à 42°C puis dénaturation de l'enzyme 5 min à 85°C

- Utilisation du kit "ThermoScript™ RT-PCR System" (Invitrogen).

La procédure expérimentale est proche de celle utilisée avec la M-MLV reverse transcriptase, mais cette enzyme présente l'avantage d'être active jusqu'à 65°C. Ceci réduit la formation de structures secondaires des ARN et permet de garder la spécificité des amorces désignées pour un gène. Cette reverse transcriptase sera donc préférentiellement utilisée pour la synthèse d'ADNc pleine longueur, utilisant une amorce spécifique, destiné par exemple à l'amplification des extrémités 5' non traduites ou à l'amplification par PCR de longs fragments d'ADN, auxquels jusqu'à 50 µg d'ARN totaux ont été utilisés par réaction. Par ailleurs, l'ensemble des composants du mélange réactionnel est inclus dans le kit.

2.4.3. Transfert d'une queue dCTP sur l'extrémité 3' des ADNc

La terminale transférase (TdT, *Terminal deoxynucleotide Transferase*) catalyse l'addition de dNTP ou ddNTP sur l'extrémité 3' d'ADN simple brin, double brin et d'ARN.

Procédure expérimentale :

Mélange réactionnel :

ADNc 12 µL

Tampon 5x 4 µL

CaCl₂ 10x 2 µL

dCTP 0.05 mM

TdT (400 unités/µl) 1 µL

H₂O qsp 20 µL

Incubation 40 minutes à 37°C

L'ADNc (12 µL) utilisé dans le mélange réactionnel provient d'ARN (50 µg) rétro-transcrit, traité à la RNase A (dégrade l'ARN simple brin), à la RNase H (dégrade l'ARN hybridé à l'ADN) et purifié sur colonne (volume d'élution 40 µL). L'ADNc avec la queue-dC est purifié sur colonne et peut être directement utilisé pour la PCR.

2.4.4. Addition d'une désoxyadénosine aux extrémités 3' des produits PCR

Les *Taq* haute-fidélité type *Pfu* n'ajoutent pas de désoxyadénosine protubérante aux extrémités 3' des produits PCR. Pour les fragments d'ADN destinés au TA-cloning, une désoxyadénosine peut être ajoutée par une *Taq* standard, type *GoTaq*. Ensuite le mélange est incubé 30 minutes à 72 °C puis purifié sur colonne. L'ADN alors est utilisable pour un TA-cloning.

Mélange réactionnel pour transfert d'un dATP :

AND (5-10 µg)	x µL
dATP (10 mM)	2 µL
Tampon 5x Green GoTaq®	10 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL
GoTaq® Flexi DNA Polymérase	0.5 µL
H ₂ O qsp	50 µL

2.5. Clonage

Après obtention d'un fragment d'ADN d'intérêt, la stratégie de clonage se décompose en quatre étapes. Il faut d'abord préparer les plasmides, insérer le fragment d'ADN dans un plasmide, afin de transformer des bactéries et permettre, à travers la croissance bactérienne, d'amplifier l'ADN recombinant. Dès lors, l'extraction des plasmides à partir de ces bactéries permet de disposer de quantité suffisante d'ADN plasmidique pour en effectuer le séquençage et identifier la nature de l'ADN recombinant.

2.5.1. Préparations des plasmides : TA-cloning

Les vecteurs commerciaux utilisés pour le *TA-cloning* sont fournis linéarisés et possèdent une thymidine protubérante sur leurs extrémités 3'. Ils ne peuvent donc se recirculariser qu'en intégrant un fragment possédant des désoxyadénosines protubérantes aux extrémités qui viennent s'hybrider par complémentarité sur les thymidines. Selon les kits,

deux modes de ligation ont été développés. Le premier fait appel à une ligase (*T4 DNA ligase*) et le deuxième à une topoisomérase :

- La *T4 DNA ligase* catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre l'extrémité 3' hydroxyle d'un nucléotide et l'extrémité 5' phosphate d'un autre nucléotide sur un ADN double brin. Cette réaction est ATP dépendante.

- La topoisomérase I, est associée au vecteur de clonage au niveau d'une séquence spécifique (5'-CCCTT) par une liaison covalente entre le 3' phosphate du vecteur et un résidu tyrosyl de l'enzyme (Tyr-274). L'énergie du groupement phospho-tyrosyl peut être transférée sur l'hydroxyle 5' du produit PCR permettant ainsi sa ligation au vecteur, la topoisomérase est alors libérée.

2.5.2. Insertion d'un fragment d'ADN dans un vecteur : étape de ligation

Les produits PCR purifiés sont insérés, par TA-cloning, dans le plasmide linéarisé pGEM®-T Easy (Promega). La ligation s'effectue à l'aide d'une enzyme phagique, la T4-DNA ligase. Un aliquot (0,5 à 4 µL en fonction des échantillons, soit environ 50 ng d'ADN) des produits PCR purifiés est ajouté à 1 µL de ligase, 1 µL de vecteur pGEM®-T Easy (50 ng/µL), 1 µL de tampon ligase (10x), et de d'eau pour un volume final de 10 µL. La ligation s'effectue à température ambiante, pendant 3 h, ou à 4°C pendant au moins 16 h.

2.5.3. Transformation bactérienne

Les bactéries utilisées sont des souches d'*Escherichia coli* Top 10 F', rendues compétentes à la transformation. Les clones positifs sont alors criblés au hasard par PCR ou mini-préparation (comme décrit précédemment).

2.5.4. Purification de l'ADN plasmidique

Une étape de purification des plasmides recombinants est nécessaire pour s'assurer de la présence de l'insert et pour son séquençage. La purification est réalisée par la méthode dite « mini- préparation », à l'aide du kit Nucleospin® Plasmid (MACHEREY-NAGEL).

2.6. Séquençage d'ADN et analyse de séquences nucléotidiques

Le séquençage est basé sur la méthode de Sanger. Il consiste en une réaction d'amplification utilisant une unique amorce, l'ADN matrice à séquencer (produit PCR ou

plasmide), des désoxynucléotides (dNTP), des didésoxynucléotides (ddNTP) marqués avec des fluorochromes et présents en basse concentration (1% par rapport aux dNTP). Au cours de la réaction de polymérisation, lorsqu'un ddNTP est incorporé, la réaction d'élongation est bloquée et le fragment d'ADN est marqué. On obtient ainsi un mélange de fragments, de toutes longueurs, qui peuvent être analysés sur un séquenceur automatique. Le séquençage se fait en collaboration avec l'Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte de Tours. La lecture des séquences est effectuée sur un séquenceur automatique à capillaires de type ABI PRISM® 3100-Avant GA. Les chromatogrammes obtenus sont analysés avec le logiciel Bio Edit. La longueur des séquences obtenues est généralement comprise entre 700 et 900 paires de bases. L'amplification et le marquage sont effectués à l'aide du kit "BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing" (Applied Biosystems) selon les instructions fournies par le fabricant. Les instructions, présentées ci-dessous, utilisent des amorces spécifiques du gène.

Mélange réactionnel :

-plasmides :	400 ng
-mix RR (kit) :	4 µL
-tampon 5x (kit) :	3µL
-amorce :	0.5 µM
-H ₂ O	qsp 20 µL

Cycle pcr :

Cycles	Températures	Temps
25	96°C	10 sec
	50°C	5 sec
	60°C	4 min
1	4°C	∞

2.7. Déphosphorylation d'un plasmide

Les produits PCR insérés, par TA-cloning, dans le plasmide pGEM®-T Easy (Promega) vont être sous-clonés dans d'autres vecteurs pour diverses applications comme l'expression en cellules végétales, en levure ou encore l'imagerie GFP.

La déphosphorylation empêche la re-circularisation sans insert d'un plasmide linéarisé lorsque les deux extrémités sont compatibles (cohésives ou à bords francs).

-La phosphatase alcaline d'intestin de veau (CIAP, *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*) utilisée, catalyse l'hydrolyse des groupements phosphates des deux extrémités 5' du plasmide digéré.

Réaction pour 5' protubérant et bords francs :

-ADN (10 pmoles d'extrémité 5') 40 µL
-Tampon CIAP 10x 5 µL
-CIAP (0.01 unité/µL) 5 µL
30 min à 37°C
+ 5 µL CIAP (0.01 unité/µL) → 30 min à 37°C

Réaction pour 5' récessif :

-Même mélange réactionnel
-15 min à 37°C puis 15 min à 56°C
+ 5 µL CIAP (0.01 unité/µL) → 15 min à 37°C puis 15 min à 56°C
-La TSAP (TSAP, *Thermo Sensitive Alkaline Phosphatase*), peut être encore utilisée. Après la réaction, les échantillons sont purifiés sur colonne

2.8. Les vecteurs de clonage

2.8.1. Description du vecteur pGEM®-T Easy

Le vecteur pGEM®-T Easy (figure 11) possède un gène de résistance à l'ampicilline, seules les bactéries transformées, c'est-à-dire ayant intégré le vecteur, sont capables de survivre sur ce milieu. La sélection des bactéries ayant intégré un vecteur avec l'insert (bactéries recombinantes) repose quant à elle sur un criblage blanc-bleu. Le vecteur de clonage pGEM®-T Easy possède le site de clonage T/A dans le gène *lacZ*. Toute insertion d'un fragment d'ADN dans le vecteur interrompt le gène *lacZ* et sera à l'origine d'une enzyme non fonctionnelle. Dans ces conditions, les colonies non-recombinantes possèdent une β-galactosidase fonctionnelle et hydrolyse le X-gal générant un produit de couleur bleu. A l'inverse, les colonies blanches indiquent que le fragment a été intégré dans le plasmide. Ces bactéries recombinantes sont donc sélectionnées pour la suite des manipulations.

2.8.2. Description du vecteur pSCA-cYFP

Ce vecteur (figure 12) a été mis au point par le laboratoire d'accueil pour l'expression de protéines en cellule végétale (Guirimand *et al.* 2009). Il est équipé d'un promoteur fort de

transcription «35S», du terminateur de transcription NOS de la *Nopaline Synthase*, d'un gène de résistance à l'ampicilline, ainsi que des séquences nécessaires à sa répllication dans *E. coli*. Ce vecteur, dérivé du pSCA de Stratagen, contient une séquence qui code pour la *yellow fluorescent protein* flankée par les sites de clonages *Bgl*II, *Spe*I et *Nhe*I.

– Digestion par une enzyme de restriction

Les endonucléases de restriction sont des enzymes qui clivent spécifiquement une séquence d'ADN (généralement palindromique) de 4 à 8 nucléotides (voire plus). Elles sont utilisées pour établir des profils de restriction ou dans les étapes de clonage. Des sites de restriction peuvent être ajoutés par PCR sur les fragments amplifiés pour faciliter la ligation.

– Ligation dans pSCA-cYFP

Les séquences amplifiées flanquées par les sites de restriction adéquates sont insérées en fusion avec la *yfp* dans le vecteur pSCA-cYFP par les sites de restrictions. On réalise une digestion par *Spe*I afin d'extraire notre fragment du vecteur pour pouvoir le sous cloner dans un vecteur d'expression de plante en fusion avec la *yfp*.

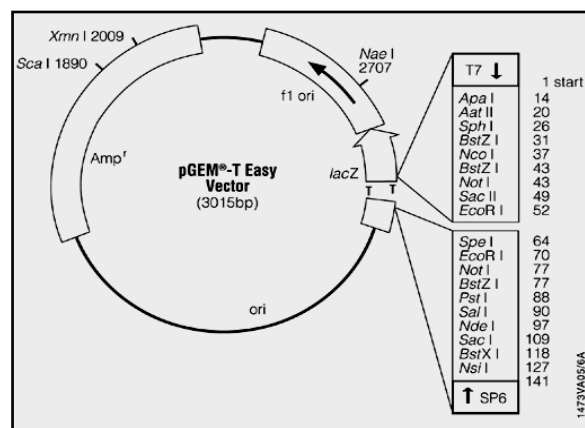


Figure 11: Carte du plasmide pGEM-T Easy (Promega).

Ce plasmide contient de nombreux sites de restriction à l'intérieur de son MCS (Multi Cloning Site). Ces sites de restriction permettent l'extraction de l'insert par digestion. Le vecteur pGEMT contient aussi les promoteurs pour les ARN polymérases T7 et SP6 de part et d'autre du MCS, lui même situé à l'intérieur de la séquence codant le peptide de la b-galactosidase. L'inactivation du peptide par insertion permet la discrimination rapide des clones positifs. Ce vecteur contient également une origine de répllication du phage f1, pour la préparation d'ADN simple brin, et une origine de répllication procaryote.

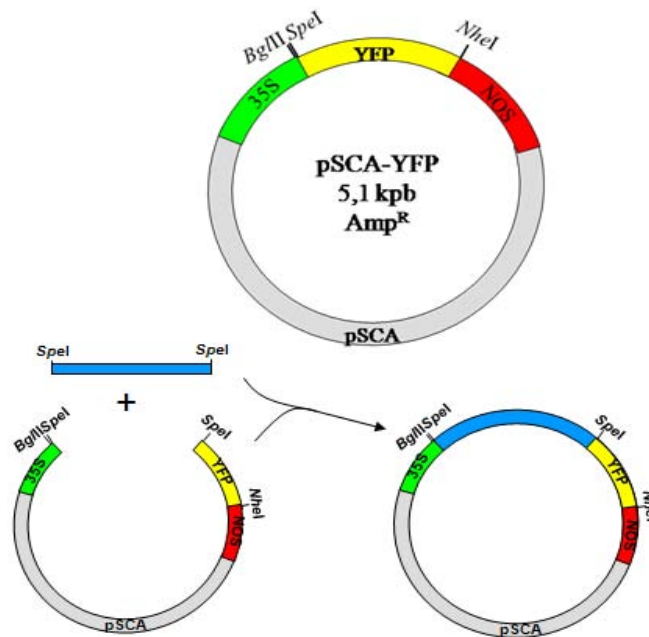


Figure 12: Carte simplifiée de l'organisation du vecteur pSCA-YFP.

Le vecteur pSC-A de 3500 pb est utilisé pour le clonage des produits de PCR, il présente le gène de résistance à l'ampiciline, notamment pour la sélection des clones recombinants.

2.9. Méthodes spécifiques à l'obtention de la séquence complète de *CrABCC1*

2.9.1. Séquences de *CrABCC1* initialement obtenues

Initialement, un fragment du gène *CrABCC1* a été obtenu par PCR sur de l'ADN génomique de *C. roseus* avec des amorces dégénérées (MRP2F et MRP4R) (MRP2F 5'-ytnccnttyathytnaayath-3' et MRP4R 5'-canarnarytgnckytgncc-3') désignées sur la base d'un alignement de séquences protéiques du clade III de la sous-famille des MRPs. La PCR sur ADN génomique, indépendante du niveau d'expression des gènes, permet de cibler l'ensemble des séquences du génome de *Catharanthus* homologues au clade III.

2.9.2. Amplification de l'extrémité 5' de *CrABCC1* : Utilisation d'ADNc-tailé

- Reverse transcription

Des résultats préliminaires ont montré par RT-PCR que *CrABCC1* est bien exprimé dans les germinations de *C. roseus*. Ce matériel végétal étant facile à obtenir et la procédure d'ajout d'une queue poly-dC par *tailing* sur cDNA nécessitant beaucoup de matériel, la matrice de départ est ici l'ARN de germination de *C. roseus*. Une reverse transcription est réalisée avec une amorce spécifique du gène cible. La population d'ARN à retro-transcrire et la longueur des ADNc à synthétiser sont ainsi réduites et l'efficacité accrue. Par ailleurs, cette étape a été réalisée à 55°C avec la RT- ThermoScript (voir méthodes 2.4.2) afin de limiter la formation de structures secondaires des ARN qui pourraient bloquer l'action de l'enzyme.

- *PCR emboîtée sur l'ADNc tailé*

Après l'ajout d'une queue dC en 3' de l'ADNc synthétisé (voir méthodes 2.4.3), une PCR semi-emboîtée, utilisant successivement deux amorces se suivant sur la séquence à amplifier, couplées à un oligo-dG (GGGGGGGGGGGGGGGGGGH), a permis d'obtenir la partie 5' de l'ADNc.

3. Méthode de biologie cellulaire

3.1. Expression génique transitoire

3.1.1. Co-culture *Agrobacterium* / cellules *C. roseus* C20D

Les cellules *C. roseus* 'C20D', sont cultivées en milieu liquide Gamborg B5 (Gamborg *et al.* 1968) contenant des sels minéraux et vitamines, 58 mM de saccharose et 4.5 µM d'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4-D) (milieu de maintenance des lignées cellulaires) (Courdavault *et al.* 2005) et sont repiquées hebdomadairement et diluées au 1/10^{ème}. L'expression transitoire en cellule est réalisée sur des cultures cellulaires de 50 mL, 3 jours après repiquage. Après les avoir filtrées puis rincées par 50 mL d'eau ultra pure, 3 g de cellules sont transférées dans un flacon de 50 mL contenant 18 mL de milieu d'infiltration (0.488g MES ; 0.25 g glucose ; 0.038g Na₃PO₄ ; pH 5.3 ; pour 50 mL de milieu) contenant de l'acétosyringone (100 µM final préparé dans du DMSO) : certains composés phénoliques, comme l'acétosyringone, stimulent la virulence des bactéries pour la transformation génétique (Vinoth *et al.* 2013). Pour que les cellules C20D respirent bien en présence d'agrobactérium, on utilise des plaques à 6 grands puits pour permettre une bonne aération. La souche *Agrobactérium* LB4404 portant la construction d'intérêt cultivée en milieu liquide (LB+ antibiotiques : Rif (20 mg/mL), Genta (40 mg/mL), Kan (100 mg/mL) + MgSO₄ (2 mM)) sur

la nuit à 28°C sous agitation est diluée au 1/10^{ème} le lendemain puis de nouveau cultivée 4 heures. Après centrifugation 5 min à 3000 *g* le culot de bactéries est repris par 1ml de milieu d'infiltration. Les cellules C20D sont dispatchées en 3 ml par puits sur les quels sont ajoutés des inoculas de 1, 2, 5, 10 et 50 μ l d'*Agrobacterium* (figure 13). La plaque est ensuite parafilmée et enveloppée par du papier aluminium puis mise dans la chambre de culture à 25°C sous agitation 2 à 3 jours avant observation au microscope à épifluorescence.

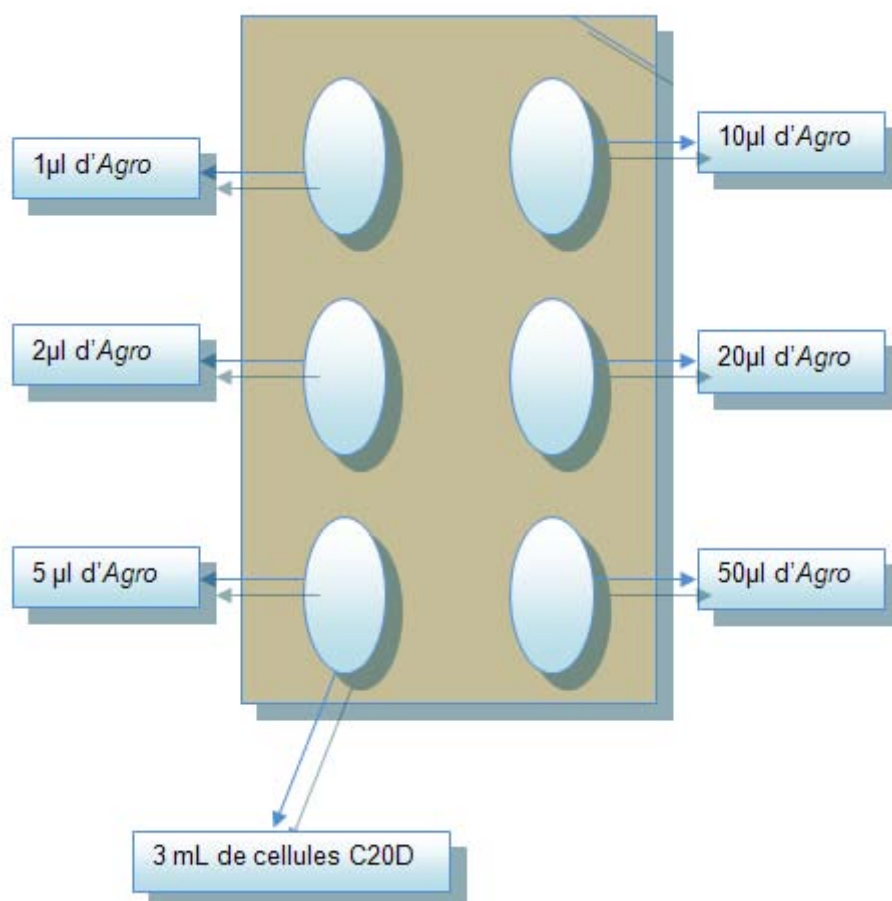


Figure 13: dispositif de l'expression transitoire par Agro-transfection en cellules C20D.
Agro: *Agrobacterium tumefaciens*.

3.1.2. Infiltration en feuilles de tabac ou *C. roseus*

Les plantes de tabac ou de *C. roseus* sont arrosées quatre heures au moins avant la manipulation. La culture d'*Agrobacterium* obtenue comme décrit dans le paragraphe 3.1.1 est injectée au niveau des plantes à l'aide d'une seringue fine qu'on applique en contact avec la

face inférieure de la feuille ; le liquide pénètre dans la feuille par les orifices stomatiques. Enfin les parties infiltrées sont délimitées à l'aide d'un feutre noir pour faciliter la détection de la zone d'intérêt pour l'observation microscopique (figure 14).

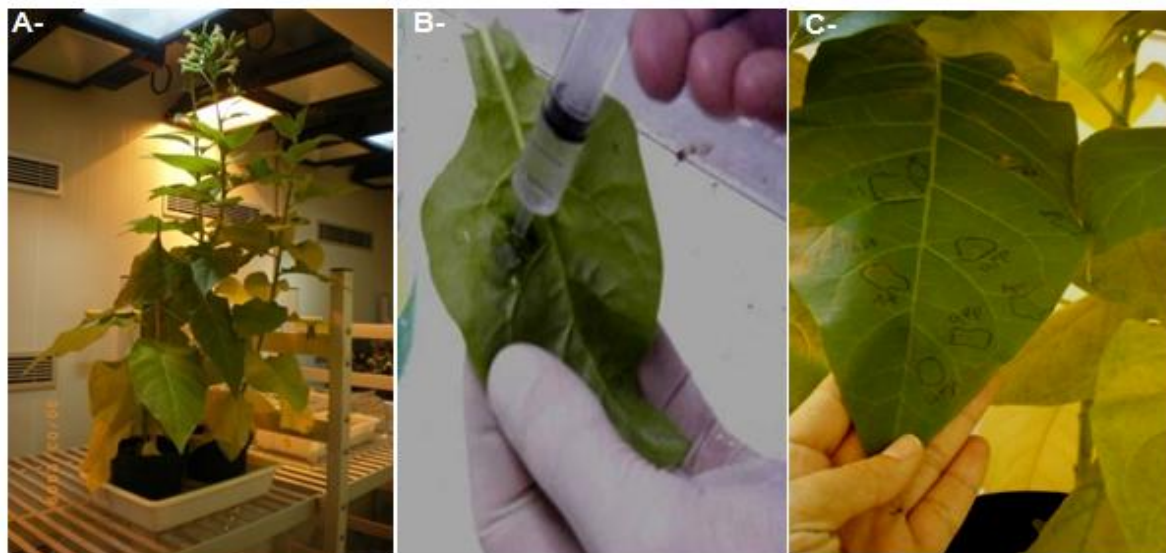


Figure 14: Etape d'infiltration dans les feuilles de tabac avec Agrobactérie.

A- Plante de tabac. **B-** Infiltration de la construction dans les feuilles de tabac à l'aide d'une seringue de 1 ml. **C-** Délimitation des zones infiltrées.

3.1.3. Par biolistique

La transformation transitoire par biolistique des cellules de *C. roseus* a été réalisée à l'aide du canon à particules Biolistic PDS-1000/HE de bio-rad (figure 15). Ce dispositif permet de bombarder les cellules par des microbilles de métal sur les quelles sont adsorbées des séquences d'ADN à exprimer. Le protocole qui consiste en 5 étapes à savoir : la préparation des tapis cellulaires, la préparation des particules, la concentration de l'ADN, l'adsorption de l'ADN plasmidique aux particules (coating) et le transfert des particules dans les cellules à transformer ; a été effectué par une technicienne au laboratoire EA2106.



Figure 15: Canon à particules Biolistic® PDS-1000/HE de bio-rad.

3.1.4. Par transfection des protoplastes

Dans un premier temps, les cellules végétales sont débarrassées de leur paroi par un traitement enzymatique. Les protoplastes obtenus sont transfectés par choc osmotique avec les différentes constructions moléculaires, où les gènes sont fusionnés à *l'orf* de *yellow fluorescent protein* fluorescente. Ainsi, la protéine de fusion synthétisée de façon transitoire par la machinerie cellulaire vient se localiser au compartiment d'adressage de la protéine de fusion qui est alors visible *via* la fluorescence de la molécule par microscopie à épifluorescence.

L'avantage de l'utilisation des protoplastes réside dans le fait que les signaux émis par la protéine de fusion, ne croisent plus avec l'autofluorescence des parois végétales, qui rendent difficilement observable les marquages au plasmalemmes, voire au tonoplaste. Trois types de protoplastes de *C. roseus* peuvent être utilisés dans cette approche : issus de cultures cellulaires liquides de *C. roseus*, C20D (étiolées) et CR6 (chlorophylliennes) ou issus de cellules de feuilles.

Les cellules C20D cultivées en Erlenmeyer de 50 ml s'organisent, dans le détail, en chaînettes. La paroi cellulaire est continue pour un même groupe de cellules. Après digestion de cette paroi, les protoplastes sphériques apparaissent sans pigmentation, car les cellules

cultivées à l'obscurité sont étiolées (figure 16). La lignée CR6 est fluorescente naturellement, et plus précisément, la chlorophylle des chloroplastes fluoresce en rouge sous UV. Pour les protoplastes de feuilles, les cellules obtenues présentent une masse importante de chloroplastes, qui sont plus volumineux que ceux observés chez CR6. Sous UV, les chloroplastes apparaissent en rouge, et les idioblastes et laticifères de *C. roseus*, chargés d'alcaloïdes, fluorescent en bleu (figure 17).

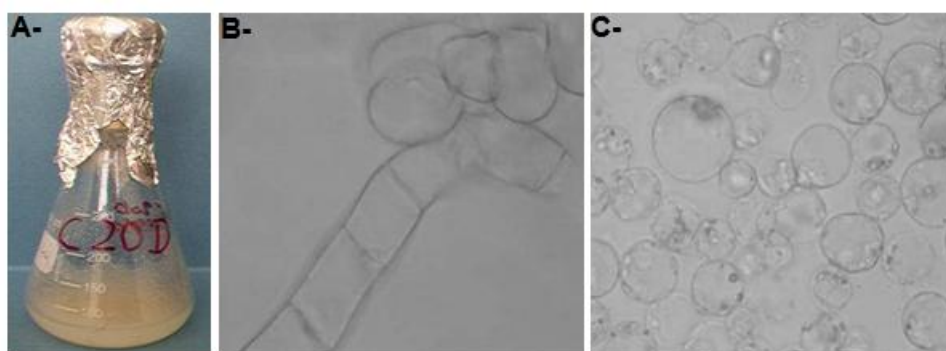


Figure 16: Obtention de protoplastes à partir des cellules C20D étiolées.

A- Cellules C20D cultivées en Erlenmeyer de 50 ml. B- Cellules C20D organisées en chaînettes. C- Protoplastes sphériques après digestion.

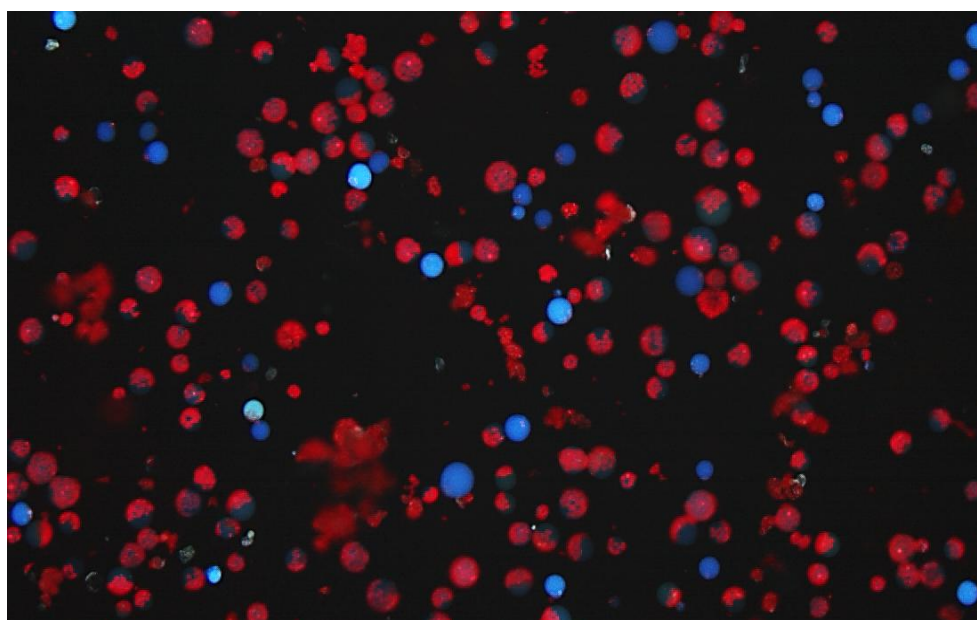


Figure 17: Observation aux UV de protoplastes de feuilles de *C. roseus*.

Les chloroplastes des cellules de mésophylle apparaissent en rouge alors que les laticifères et idioblastes, chargés de vinca-alcaloïdes, fluorescent en bleu.

Protocole :

Le protocole que nous avons suivi est adapté du protocole d'He *et al.* 2007.

Obtention des protoplastes

- A partir de culture de cellules de *C. roseus* avec 2,4D.

Les protoplastes sont obtenus à partir de cultures cellulaires de *C. roseus* âgées de 3 à 6 jours. On introduit environ 10 grammes de cellules dans 15 mL de la solution d'enzyme. La digestion de la paroi cellulaire se fait dans une solution enzymatique isotonique contenant 1% de cellulase pour la digestion de la cellulose, 0.2% de macerozyme, pour la digestion de la lamelle moyenne et des autres composés constituant la paroi et 0, 1% de BSA pour limiter l'action des protéases de la macerozyme. Après 1h30 à 2h de digestion à 27°C sous agitation douce (environ 50 rpm), les protoplastes sont filtrés sur une toile à Bluter d'un maillage de 100 µm de façon à récupérer les protoplastes. Les protoplastes culottés (par centrifugation 5min/ 100g/ RT : 25-27°C, ensuite le surnageant est éliminé à l'aide d'une trompe à vide et une pipette Pasteur) sont lavés avec une solution isotonique saline W5 (tableau 8), par une série de deux centrifugations/resuspensions.

- A partir de feuilles de *C. roseus*

La procédure employée est la même que pour les cultures cellulaires décrites précédemment, seule la première étape diffère : les jeunes feuilles de *C. roseus* (2-3 cm) sont découpées en très fines lamelles, avec une lame de rasoir pour être ensuite placées dans la solution enzymatique. Le temps de digestion des parois cellulaires est étendu à 3-4 heures. Les Protoplastes libérés sont ensuite préparés comme décrit précédemment.

Composition	Masse molaire	Concentration finale	Masse pour un Vf=500mL
NaCl	58.44 g mol ⁻¹	154 mM	4.5 g
CaCl ₂ (2H ₂ O)	147.02 g mol ⁻¹	125 mM	9.19 g
KCl	74.55 g mol ⁻¹	5 mM	0.19 g
Glucose	180.15 g mol ⁻¹	5 mM	0.45 g
MES	195.25 g mol ⁻¹	1,5 mM	0.15 g

Tableau 8: Composition de la solution isotonique W5.

Le pH est ajusté à 5, 6 ensuite la solution est autoclavée.

Transfection des protoplastes

- A partir de culture de cellules *C. roseus* avec 2,4-D

La transfection des protoplastes, avec les plasmides d'intérêt, se fait à l'aide d'une solution de Ca^{2+} /PEG 40% fraîche (tableau 9). Le choc osmotique permet l'entrée de l'ADN dans les protoplastes, dont la membrane plasmique est perméabilisée par le Ca^{2+} . Généralement 10 μL d'ADN plasmidique (soit 20-30 μg) sont placés dans un tube Eppendorf de 2 mL (avec bout arrondi) aux quels sont ajoutés 100 μL de protoplastes ($4-5 \cdot 10^6$) à l'aide d'un cône coupé et le tout est mélangé délicatement par flicking, ensuite on ajoute 100 μL de solution Ca^{2+} /PEG. Le mélange est incubé 20 à 30 minutes à 22-23°C, tube couché ensuite 440 μL de la solution W5 sont ajoutés tout en mélangeant délicatement le tube par inversion. Le surnageant est éliminé par une centrifugation 5min/100g/RT° ensuite les protoplastes sont resuspendus dans 1mL de la solution W5. Les cellules transfectées sont incubées 24-48h à l'obscurité (culture cellulaire) avant les observations ensuite la fluorescence des protéines fusionnées à l'YFP a été visualisée en utilisant le filtre JP2 (Chroma #31040; filtre d'excitation 500-520 nm, filtre d'émission 540-580 nm) et un microscope à épifluorescence 'Olympus BX51' équipé d'un appareil photo numérique 'Olympus DP50'.

La molécule	Masse molaire	Concentration finale	Masse pour un Vf=5mL
$\text{CaCl}_2 (2\text{H}_2\text{O}) : 05\text{M}$	147. 02 g mol ⁻¹	0. 1 M	0. 367
Mannitol	182. 17 g mol ⁻¹	0. 4 M	0.364
PEG 4000	40%		2

Tableau 9: Composition de la solution PEG.

3.2. La méthode de Dipping florale

Une des étapes limitante pour le bon déroulement de l'expérience est de vérifier quelle souche d'Agrobactérie est la plus appropriée : la souche LBA4404 ou Agl1 ? L'ADN-T, portant la cassette d'expression d'intérêt est introduit dans le plasmide binaire pBi102. Les Agrobactéries recombinantes ont été obtenues par intégration des plasmides binaires dans la souche LBA4404 et sont utilisées pour effectuer la-transformation. Pour cette raison il nous a

fallu partir deux jours en avance d'un repiquage d'*Agrobacterium* à partir de colonies fraîches de la souche « LBA4404 » se développant sur des boîtes LB avec antibiotiques « RGK ». Ensuite les colonies renfermant notre gène d'intérêt sont inoculées dans les 5 mL du milieu LB avec antibiotiques et MgSO₄ (2 mM) pour éviter les floculations. Les bactéries poussent à 160 rpm/27°C/24 H. Ensuite l'ADN est extrait à l'aide d'un kit, et les *E. coli* thermocompétantes sont transformées avec 3 µL d'ADN propre et laissées régénérer 4 heures à 27°C. Ensuite après étalement, les bactéries pousseront 24 heures à 27°C et une culture est relancée cette fois ci à partir d'*E.coli* puis l'ADN plasmidique est extrait et on effectue une digestion enzymatique dans le but de s'assurer du bon choix de la souche d'Agrobactérie utilisée (la souche LBA4404 ou Agl1). Les résultats ont montré que la souche Agl1 est la bonne, en effet sur 17 clones testés aucun n'est recombiné, alors que pour LBA4404, sur les 16 clones, 3 ne représentent pas les bandes attendues. Donc la suite du travail est effectuée avec la souche Agl1.

Les plantes sauvages d'*Arabidopsis thaliana* écotype Columbia (Col 0) obtenus à partir du "Nottingham Arabidopsis Stock Centre" ont été génétiquement transformées par la méthode du « *floral dipping* » (Clough et Bent, 1998). Les plantules d'*Arabidopsis* sont cultivées jusqu'à apparition des premières siliques matures. La souche d'*Agrobacterium tumefaciens*, préalablement transformée par la construction désirée, est mise en culture jusqu'à une DO₆₀₀ d'environ 2. Les bactéries sont ensuite culotées puis resuspendues dans un milieu saccharose (5% : p/v) et Silwett L77 (0.02% : v/v). Après avoir éliminé les siliques matures, les plantules sont entièrement immergées dans la suspension d'Agrobactérie durant 5 secondes, ensuite remises en chambre de culture enrobées dans un film plastique, en faible éclairage pendant 48 h, puis en conditions classiques. Les graines transgéniques ont été sélectionnées sur des boîtes de milieu MS (Duchefa) additionnées de 50 µg/mL de kanamycine. Les plants résistants à la kanamycine ont été transférés en terre jusqu'à récolte des graines. Trois lignées transformées ont été analysées histochimiquement pour l'activité GUS pour chaque expérience.

3.3. Observation au microscope à épifluorescence

Les cellules ayant subits la transfection sont observées au microscope à épifluorescence (microscope OLYMPUS BX51 avec caméra numérique). Les protoplastes sont observés à différents grossissements aux longueurs d'onde du visible sans filtre, ainsi qu'avec le filtre correspondant au spectre d'émission de la protéine utilisée.

- **La GFP** « Green Fluorescent Protein » : Elle est très stable et tolère des températures jusqu'à 65°C et un pH allant de 5,5 à 12,2. La protéine fluorescente verte est une protéine ayant la propriété d'émettre une fluorescence de couleur verte. La longueur d'onde d'émission maximale est à 504 nm.

- **La YFP** « Yellow Fluorescent Protein » : La protéine fluorescente jaune, est une protéine produite à partir d'un mutant du gène codant la protéine fluorescente verte (GFP). Cette protéine émet de la fluorescence à une longueur d'onde de 527 nm, lorsqu'elle est excitée par une lumière de longueur d'onde de 514 nm.

- **La chlorophylle** : Pour les cellules du mésophylle de *C. roseus*, une observation supplémentaire est réalisée sous UV afin de visualiser l'autofluorescence, en rouge, des chloroplastes de protoplastes, autour de 665 nm.

4. Les traitements hormonaux et nutritionnels

Les germinations d'*Arabidopsis thaliana* âgées de trois jours ont été transférées sur des boîtes de pétri orientées verticalement et contenant du milieu MS 0.5x (Murashige et Skoog) gélosé auquel nous avons ajouté des concentrations croissantes de phytohormones. Les germinations d'*Arabidopsis* ont été cultivées quatre jours avec des traitements hormonaux : l'acide abscissique (ABA), l'acide gibbérellique (GA3), l'acide indole-3-acétique (AIA), l'acide 1-naphtalène acétique (ANA) ou la zéatine (tous de Sigma).

Pour les traitements nutritionnels avec du nitrate, sulfate, phosphate et saccharose, les boîtes contenaient du milieu MS solide «homemade» dans lequel les nutriments testés ont été omis (Dixon et Gonzales, 1994). Les concentrations croissantes des nutriments appropriés ont été ajoutées à partir de solutions stock pour compléter les boîtes en éléments nutritifs (KNO₃, KH₂PO₄, MgSO₄ ou saccharose). Les plantules de trois jours qui ont germé verticalement sur le milieu MS «homemade» ont été alors transférées délicatement à l'aide d'une pince stérile sur "les boîtes complémentées de nutriments" maintenues en position verticale. Les germinations sont restées cinq jours sur les boîtes contenant les traitements minéraux et six jours sur les boîtes contenant le saccharose.

Après traitements, les germinations ont été ensuite soumises à la localisation histochimique de l'activité GUS et au dosage fluorimétrique MUG afin de quantifier leur activité β -glucuronidase.

5. Localisation histochimique de l'activité GUS

L'activité glucuronidase (GUS) est détectée par coloration histochimique à l'aide d'un substrat chromogène de cet enzyme : le X-gluc : Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide (Jefferson, 1989). Les différents organes, les germinations et les sections transversales coupées à la main ont été incubées pendant 16 heures (sinon indiquer dans les légendes des figures) à 37°C dans le tampon de réaction GUS (1 mg/mL de X-Gluc dans du phosphate de sodium (0.5 mM, pH 7), avec 10 mM Na-EDTA, 0.5 mM ferrocyanure de potassium, 0.5 mM ferricyanure de potassium et 1% de Triton X-100). Avant l'observation, les tissus chlorophylliens et les plantules ont été dépigmentées dans un bain d'éthanol 96% pendant 16h et 2h, respectivement, et peu à peu réhydratés à température ambiante avec une série de rinçage à l'éthanol, 10 min chacun: 70%, 50%, 25% et enfin conservés dans du glycérol/eau 50/50 (p/v) avec NaN₃ (0.02%). Les observations histochimiques ont été effectuées à l'aide d'une loupe «Olympus SZ40» couplé à une caméra «Leica DFC280» ou à l'aide du microscope «Olympus BX51» relié à une caméra «Leica DP71».

6. Dosage fluorimétrique

Le dosage fluorimétrique de l'activité GUS (Jefferson, 1989) a été effectué sur les cotylédons ayant germé quatre, cinq ou six jours sur différents milieux de culture supplémentés d'hormones, de nutriments ou de saccharose, respectivement (voir paragraphe 4 de cette section). La morphologie des racines varie considérablement sous l'influence des différents traitements, pour cette raison les dosages enzymatiques ont été réalisés sur les cotylédons, plus homogènes, permettant une meilleure quantification. Les expériences ont montré que l'activité GUS n'a été observée que près des veines de cotylédons. Pour chaque traitement, les cotylédons de six plantules ont été analysés. Les cotylédons ont été placés dans un microtube contenant deux billes de verre de 5 mm de diamètre, congelés dans l'azote liquide et secoués dans un broyeur à billes (MM-400, Retsch) à 30 cycles/sec pendant deux minutes. Les cotylédons broyés, ont été suspendus dans 450 μ L de tampon d'extraction GUS (50 mM NaHPO₄ (pH 7), 10 mM 2- β -mercaptoéthanol, 10 mM Na₂EDTA, 0.1% de sodium lauryl sarcosine et 0.1% de Triton X-100) et centrifugés à 10.000 g pendant 10 min à 4°C. La quantité de protéines solubles présentes dans le surnageant est déterminée selon la technique de Bradford (BioRad). Pour les dosages enzymatiques GUS, 100 μ L du surnageant ont été mélangés avec 80 μ L de tampon d'extraction GUS et 20 μ L de 4-méthylumbelliféryl-b-D-

glucoside (MUG) à 3,5 mg/mL et incubés 2 h à 37°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 450 µL d'une solution de Na₂CO₃ (0.2 M) mise au préalable au froid. La fluorescence a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à fluorescence (F-4500, Hitachi) et des solutions étalons standard de 4 méthylumbelliférone (4-MU). L'activité enzymatique GUS est exprimée en pmoles 4-MU produite par minute et par milligramme de protéine. Les données représentent l'activité enzymatique moyenne GUS ± l'écart type de six expériences distinctes et sont exprimées par rapport aux conditions de référence. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le test *t* de Student.

7. Etablissement de lignées knock-out homozygotes pour *AtABCC13*

L'établissement de lignées knock-out a été facilité par l'existence de mutants d'insertion d'*AtABCC13*, disponibles dans les banques de graines d'*Arabidopsis*, notamment au *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) : SALK 044759.55.75 pour KO1 et WiscDsLox397H11 pour KO4. Les graines ont été semées et les plantes menées à fleurs pour l'autofécondation. Par la suite, différents individus issus de la descendance ont été génotypes. Les KO homozygotes ont enfin été évalués pour l'expression d'*AtABCC13* par RT-PCR. Les lignées knock-out (KO1 et KO4) homozygotes obtenues ont servi à effectuer le phénotypage et différents tests de croissances racinaires.

8. Analyses phylogénétiques et topologiques

Les séquences de *C. roseus* ont été récupérées dans la base de données Medicinal Plant Genomics Resource (<http://medicinalplantgenomics.msu.edu/>) et en utilisant successivement comme requête, les 15 séquences protéiques ABCC d'*Arabidopsis* dans l'option BLAST Search. Le logiciel BLAST permet de comparer une séquence, nucléique ou protéique, dite requête (ou *Query*), à une banque de séquences, nucléiques ou protéiques.

Les homologues de *CrABCC1* ont été récupérés dans la base de données NCBI limitée aux organismes sélectionnés à l'aide du programme TBLASTN et en utilisant les séquences protéiques de *CrABCC1* ou d'*ABCC10* comme requête. Pour chaque organisme, les trois premières séquences blastées ont été associées, ou non, au clade III des ABCCs en générant un arbre phylogénétique incluant les ABCCs d'*Arabidopsis* et d'homme.

Les arbres phylogénétiques ont été générés sur le site Phylogeny.fr (www.phylogeny.fr) avec la méthode PhyML option « A la carte ». Les arbres

phylogénétiques ont été édités avec le site Phylodendron (iubio.bio.indiana.edu/treeapp/) et recolorés avec le logiciel Adobe Illustrator®.

Les segments transmembranaires prédits ont été identifiés à l'aide des séquences protéiques et le serveur de prédiction Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) au centre de Bio-informatiques de Stockholm.

Chapitre III. Résultats et discussions



Etude du transporteur CrABCC1



I. Etude du transporteur CrABCC1 de *Catharanthus roseus*

1. Généralité sur la plante modèle : *Catharanthus roseus*

1.1. *Catharanthus roseus* : plante médicinale

Catharanthus roseus (figure 18) est une dicotylédone, tropicale, vivace de la famille des Apocynacées (Verna et Singh, 2010). Son nom scientifique actuellement utilisé est *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, elle est également appelée *Vinca rosea*, *Vinca madagascarensis*, Pervenche rose, catharanthe ou rose amère (Van Der Heijden *et al.* 2004). Les fleurs sont de couleurs roses (rosea) ou blanches (alba) (Jaleel *et al.* 2008), formées de 5 pétales spiralées de forme ovale, sources d'anthocyanes (Filippini *et al.* 2003). Les feuilles sont glabres des deux côtés et leur face supérieure est brillante, de couleur verte (Stearn, 1975). Les fruits sont deux follicules cylindriques déhiscent contenant chacun 12 à 20 graines brunâtres et arrondies (Stearn, 1975). Originaire de Madagascar (Alam *et al.* 2011), elle est introduite en France au XVII^{ème} siècle. C'est une plante ornementale et médicinale (Mishra et Kumar, 2000) et les vertus médicinales qu'on lui prête sont nombreuses. En effet, elle est utilisée pour le traitement du diabète (Githens, 1949), dysenterie (Virmani *et al.* 1978), piqûre d'insecte (Sukumar et Osmani, 1981), cycle menstruel irrégulier (Perry, 1980) et infections de la peau (Virmani *et al.* 1978). Certaines parties de la plante possèdent un effet antimicrobien contre *Vibrio cholerae* et *Mycobacterium pyrogenous* (Virmani *et al.* 1978). *C. roseus* est largement étudiée pour ses alcaloïdes, elle est devenue un modèle pour l'étude du métabolisme secondaire chez les plantes (Ziegler et Facchini, 2008). Les premiers travaux de recherche menés sur *C. roseus* révèlent que cette plante est l'unique source d'alcaloïdes à propriétés anti-tumorales, raison pour laquelle cette dernière est cultivée à très grande échelle car les rendements de biosynthèse *in planta* sont extrêmement faible.

1.2. *Catharanthus roseus* : source d'alcaloïdes anticancéreux

C. roseus est considérée comme la plante médicinale la plus étudiée à l'heure actuelle pour son métabolisme secondaire (Kutchan, 2005). En effet, c'est une espèce connue pour la production des alcaloïdes indoliques monoterpéniques (AIM) dont beaucoup d'entre eux sont d'intérêt pharmaceutique (Zhou *et al.* 2009). Elle présente un métabolisme complexe avec plus de 130 AIMs (Facchini, 2001 ; Van der Heijden, 2004 ; Xing *et al.* 2011 ; Fernández-Pérez *et al.* 2013). Les alcaloïdes identifiés et/ou isolés à partir des différents organes de la plante (Duffin, 2000-2002a-2002b ; Van der Heijden *et al.* 2004), sont appelés vinca-alcaloïdes, rappelant *Vinca rosea*, désignant *C. roseus* dans l'ancienne nomenclature.

La plupart de ces alcaloïdes appartiennent à la classe des AIM. Il existe en effet deux types d'AIM : les AIMs de type monomère (ajmalicine, serpentine, catharanthine, vindoline...) et les AIM de type dimères (vinblastine, vincristine...) présents en plus faible quantité. L'ajmalicine et la serpentine sont prescrits pour le traitement de l'hypertension, alors que les bisindoles (vinblastine, vincristine et 3',4'-anhydrovinblastine) sont utilisés pour leur activité antinéoplasique dans le traitement de nombreux cancers (Zhou *et al.* 2009).

La vincristine et la vinblastine disposant de propriétés antitumorales (Noble, 1990 ; Levêque *et al.* 1996), sont les plus célèbres et les plus utilisés en chimiothérapie anticancéreuse depuis 30 ans (Donehover *et al.* 1993 ; Levêque *et al.* 1996). En effet, la vincristine est considérée actuellement comme l'anticancéreux le plus puissant dans le traitement des leucémies lymphoblastiques aiguës ou des myélomes multiples (Egbelakin *et al.* 2012). D'autre part, la chimiothérapie avec la vinblastine semble être d'un intérêt particulier pour le traitement des lésions de l'histiocytose à cellules de Langerhans systémique dans les endroits non-opérables (Ng Wing Tin *et al.* 2011). Ces deux alcaloïdes précieux sont accumulés en quantités infimes dans les feuilles, environ 0.005% (Barthe *et al.* 2002) et sont des produits de couplage oxydatif de la catharanthine et vindoline. En 1983, un nouvel alcaloïde synthétique antitumoral est apparu : la vindésine, obtenue par hémisynthèse chimique à partir de la vinblastine. Ensuite en 1989, la vinorelbine, était le deuxième médicament non naturel dans ce groupe, obtenu en couplant les deux alcaloïdes monomères, catharanthine et vindoline (Barthe *et al.* 2002). Différents gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des AIM chez *C. roseus* (figure 19) ont été clonés et séquencés pour l'analyse de leur expression dans différents organes de la plante (Mahroug *et al.* 2006).



Figure 18: Représentation photographique de la Pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*).

1.3. *Catharanthus roseus* : Voie de biosynthèse des Alcaloïdes Indoliques

Monoterpéniques

Les voies de biosynthèse des AIM et les facteurs régulant leur production sont peu connus, en raison de la multitude et de la complexité des étapes. Les études biochimiques ainsi que l'élucidation de certaines voies de biosynthèse ont permis l'identification de réactions biochimiques hautement spécifiques, impliquées dans la synthèse des alcaloïdes d'intérêts (De Carolis et De Luca, 1993 ; St-Pierre *et al.* 1998 ; Ziegler et Facchini, 2008).

La biosynthèse d'AIM de *C. roseus* (figure 19) compte plusieurs étapes enzymatiques (Guirimand *et al.* 2010a). La tryptamine (précurseur indolique d' AIM de *C. roseus*) provient de la décarboxylation du tryptophane sous l'action de l'enzyme tryptophane décarboxylase (TDC), dans le cytoplasme (De Luca *et al.* 1989 ; Pennings *et al.* 1989). La sécologanine (précurseur terpénique de la strictosidine), est synthétisée en plusieurs étapes et a pour origine l'isopentényl diphosphate (IPP) et son isomère le diméthylallyl diphosphate (DMAPP). L'IPP et le DMAPP sont les précurseurs commun de tous les isoprénoïdes, et ont pour origine deux voies de biosynthèse possibles qui sont la voie du méthylérythritol 4-phosphate (voie MEP) et la voie du mévalonate (voie MVA).

Les étapes précoces de la voie de biosynthèse des AIM, aboutissent à la synthèse de la strictosidine, premier AIM de type monomère et précurseur unique de tous les autres AIM de *C. roseus* (figure 19). La strictosidine est donc formée alors suite à la condensation d'un précurseur indolique, la tryptamine, issue de la voie des indoles, et d'un précurseur terpénique, la sécologanine, issue de la voie des monoterpènes séco-iridoïdes (MTSI) elle-même alimentée par la voie du méthylérythritol 4-phosphate (MEP) (figure 19). Cette condensation est catalysée par la strictosidine synthase (STR) (De Waal *et al.* 1995) à l'intérieure de la vacuole (McKnight *et al.* 1991 ; Guirimand *et al.* 2010b). Les modifications successives de la strictosidine et de ses dérivés (figure 19), conduisant à la synthèse des 130 AIM de *C. roseus* connus à ce jour, constituant les étapes tardives de la voie. Cette strictosidine va subir une réaction de déglucosidation pour libérer un aglycone de strictosidine sous l'action de la strictosidine β -D-glucosidase (SGD) (Geerlings *et al.* 2000). L'aglycone de strictosidine est rapidement converti en dialdéhyde et subit ensuite une série de transformations menant à la formation de cathenamine (Gröger, 1985). A partir de cette étape, plusieurs voies de biosynthèse latérales conduisent à la formation des différentes sous-familles d'AIM (Hallard, 2000) : les AIM monomères dont fait partie la catharanthine et les

AIM monomères dont la voie de biosynthèse est la mieux caractérisée et aboutissant à la formation de la vindoline suite à six étapes enzymatiques à partir de la tabersonine. Les deux dernières étapes de synthèse de la désacétylvindoline puis de la vindoline sont respectivement catalysées par la désacétoxyvindoline-4-hydroxylase (D4H) (De Carolis et De Luca, 1993 ; St-Pierre *et al.* 1998 ; Vasquez-Flota *et al.* 1997) et par la désacétylvindoline-4-O acétyltransférase (DAT) (Laflamme *et al.* 2001 ; St-Pierre *et al.* 1998-1999). La synthèse des AIM dimères qui se réalise dans les organes aériens résulte ensuite de la condensation par couplage radicalaire de la catharanthine et de la vindoline et serait catalysée par une enzyme de type peroxydase (PRX1) (Costa *et al.* 2008 ; Hilliou *et al.* 2002 ; Sottomayor *et al.* 1998 ; Sottomayor et Ros Barcelo, 2003) pour former un iminium qui pourra être converti en 3,4-anhydrovinblastine. De ces composés dériveront ensuite les AIM dimères d'intérêt, vinblastine et vincristine. Les travaux récents de (Roepke *et al.* 2010) ont par ailleurs montré que l'AIM monomère précurseur de la vinblastine, la catharanthine, est sécrétée par la feuille tandis que la vindoline est contenue dans les vacuoles des cellules spécialisées de feuilles (laticifères et idioblaste). D'où la nécessité d'une étude exhaustive et approfondie des localisations subcellulaires des enzymes impliquées dans les étapes tardives (post-strictosidine).

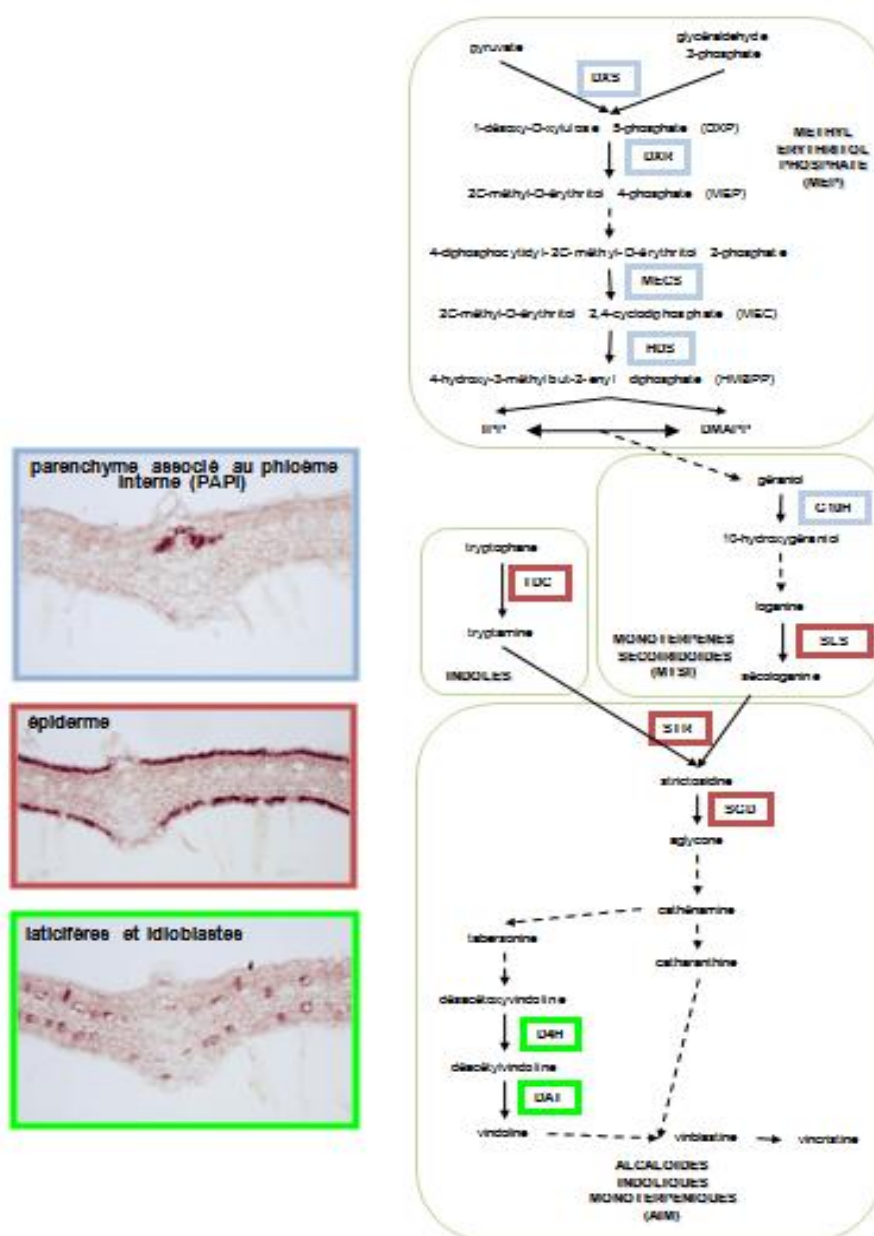


Figure 19: Biosynthèse des alcaloïdes dans des jeunes feuilles de *C. roseus* et compartimentation tissulaire.

DXS: 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase ; DXR: 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate réducto-isomérase; MECS: 2-C-méthyl-D-érythritol-2,4-cyclodiphosphate synthase; HMBPPS: 1-hydroxy-2-méthyl-2(E)-butenyl 4-diphosphate synthase; G10H: géraniol 10-hydroxylase; SLS: sécologanine synthase; STR: strictosidine synthase; SGD: strictosidine b-glucosidase; D4H: désacétoxyvindoline-4-hydroxylase; DAT: désacétylvindoline-4-O-acétyltransférase. Les traits en pointillés indiquent plusieurs étapes successives. D'après St-Pierre *et al.* (1999) ; Irmeler *et al.* (2000); Burlat *et al.* (2004).

1.4. Compartimentation cellulaire et subcellulaire de la biosynthèse des AIM

Au niveau des organes aériens (jeunes feuilles, tiges et bourgeons floraux) de *C. roseus*, trois tissus différents ont été identifiés, principalement par hybridation d'ARNm *in situ*, comme étant impliqués dans la biosynthèse des AIM anticancéreux (Mahroug *et al.* 2007). Les transcrits de gènes codant des enzymes de la voie MEP, à savoir la DXS, la DXR, la MECS et la HDS, ainsi que ceux de la G10H (première enzyme de la voie MTSI), ont été spécifiquement localisés au niveau de cellules parenchymateuses associées au phloème interne (PAPI) (figure 20) (Burlat *et al.* 2004 ; Courdavault *et al.* 2005 ; Lemenager *et al.* 2005 ; Oudin *et al.* 2007). Les protéines SLS (figure 19) sont uniquement détectées dans les épidermes en immunocytochimie (Irmeler *et al.* 2000). Enfin, les gènes DH4 et DAT (figure 19) catalysant les étapes terminales de la biosynthèse de la vindoline, s'expriment dans un troisième tissu constitué de cellules spécialisées qui sont les laticifères et les idioblastes, toujours dans les parties aériennes de la plante (St-Pierre *et al.* 1999 ; Irmeler *et al.* 2000). Au final, au moins trois types cellulaires distincts participent aussi bien dans les étapes précoces que tardives de la biosynthèse des AIM dans les parties aériennes de la plante. Récemment, les travaux de Murata *et al.* (2008), proposent un modèle suggérant que la voie de biosynthèse de la vindoline jusqu'à la 16 méthoxytabersonine est exprimé dans l'épiderme des feuilles (figure 20), ensuite un intermédiaire indéterminé est transporté vers les cellules adjacentes du mésophyle, idioblastes spécialisées et/ou laticifères, pour l'élaboration finale en vindoline (Murata *et al.* 2008). Contrairement aux cellules épidermiques des feuilles qui sont le siège de la voie du mévalonate (MVA) qui fournit l'IPP pour la biosynthèse de triterpènes, les cellules du «PAPI» expriment préférentiellement la voie du MEP et G10H (figure 20). Cela soulève des questions sur les rôles joués par ces deux types cellulaires concernant l'IPP nécessaire à la biosynthèse de sécologanine dans l'épiderme de la feuille (Murata *et al.* 2008).

En plus de la compartimentation cellulaire, la voie de biosynthèse des AIM présente un degré de complexité supplémentaire avec l'intervention de nombreux compartiments sub-cellulaires. Les différents degrés de compartimentation de cette voie de biosynthèse : différents organes, différents types cellulaires, différents compartiments sub-cellulaires (figure 21) constituent un obstacle majeur pour la production de vinblastine et vincristine dans des suspensions cellulaires indifférenciées ou partiellement différenciées cultivées *in vitro*. L'analyse bioinformatique des séquences codantes des enzymes de la voie MEP chez toutes les espèces végétales indique la présence potentielle d'un peptide d'adressage aux plastides

suggérant une localisation exclusive de cette voie dans ce compartiment subcellulaire (Lange et Ghassemian, 2003).

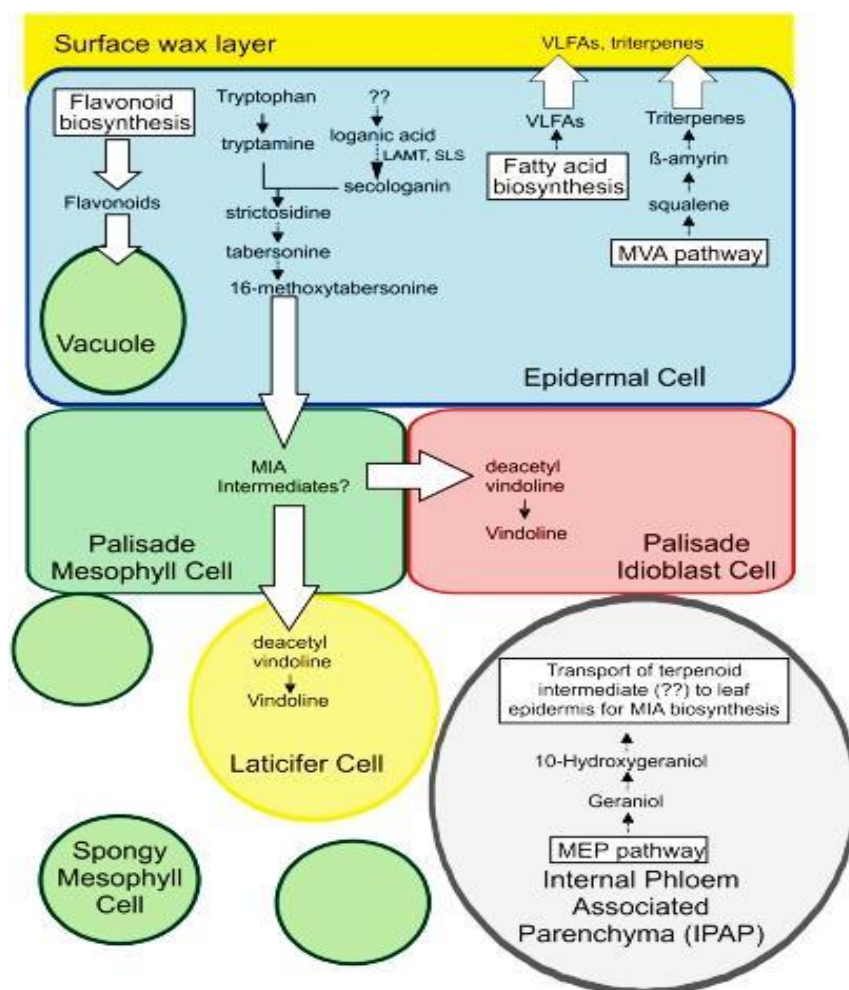


Figure 20: Les cellules épidermiques des feuilles de *Catharanthus roseus* exprimant les voies de biosynthèse des AIM, MVA/Tritérpene, VLFA et des flavonoïdes.

D'après (Murata *et al.* 2008). AIM: Alcaloïdes Indoliques Monoterpéniques; MVA: Mévalonate; VLFA: very-long-chain fatty acids

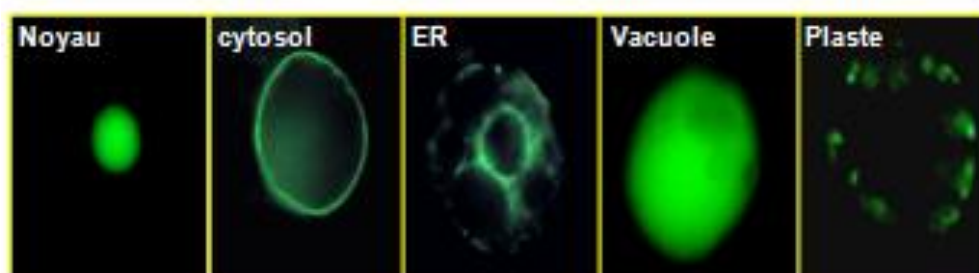


Figure 21: différents compartiments sub-cellulaires de la voie métabolique des AIM.

Cette localisation a été confirmée chez *C. roseus* pour le HDS par immunolocalisation de l'enzyme dans le stroma des plastes en microscopie électronique en transmission (Oudin *et al.* 2007 ; Guirimand *et al.* 2009). Il apparaît clairement que cette voie de biosynthèse et de stockage des AIM dans la plante, répartie sur plusieurs tissus et organelles, nécessite des translocations de molécules certainement associées à des transporteurs membranaires qui sont à ce jour encore non identifiés.

2. Rappel et complément sur les transporteurs ABCC

Ces transporteurs ABC appartiennent à une famille de protéines hautement conservées présente aussi bien chez les procaryotes et les eucaryotes (Higgins, 1992 ; Rea *et al.* 1998) ; ils transportent une grande variété de substrats structurellement indépendants d'une manière ATP dépendante, généralement contre un gradient de concentration (Higgins, 1992 ; Rea *et al.* 1998 ; Rees *et al.* 2009). Les ABCCs 'full size' sont restreints aux eucaryotes (Higgins, 1992 ; Tusnady *et al.* 2006) ; cette sous-famille se distingue par une extension N-terminale, hydrophobe, (TMD0) qui comprend cinq hélices transmembranaires et une loupe cytosolique (L0) (Tusnady *et al.* 1997). L'extension additionnelle 'TMD0-CL0' confère la topologie typique des ABCCs : TMD0-CL0-TMD1-NBD1-TMD2-NBD2. La contribution du TMD0-CL0 à la spécificité aux substrats n'est pas totalement élucidée, mais l'implication de la partie TMD0 dans la localisation subcellulaire de plusieurs protéines ABCCs humain et de levure et a été étudiée (Fernandez *et al.* 2002 ; Mason and Michaelis, 2002 ; Westlake *et al.* 2003 ; Westlake *et al.* 2005 ; Bandler *et al.* 2008). Outre leur implication présumée dans une multitude de fonctions, la région N-terminal typique 'TMD0' donne un aspect original et intrigant aux transporteurs ABCC.

Chez les plantes, après les ABCB, les ABCC constituent la deuxième sous-famille la plus représentée des transporteurs ABC 'full size' (Sanchez-Fernandez *et al.* 2001) et sont impliqués dans divers processus physiologiques liés au développement et à l'adaptation des plantes aux stress (Kolukisaoglu *et al.* 2002 ; Rea, 2007 ; Kang *et al.* 2011). Cependant, malgré les nombreux progrès récents, la plupart des ABCCs de plantes sont peu caractérisés fonctionnellement à ce jour. Les recherches ont montré que chez les plantes, les ABCCs sont impliqués dans le transport des métabolites secondaires (, 2006). Chez le maïs ou le tabac par exemple, les protéines ABC ont été impliquées dans le transport de métabolites secondaires tels que les anthocyanines agissant comme filtres UV ou les terpènes antifongiques agissant en tant que barrière de défense (Rea, 2007). En effet, ZmMRP3 du maïs est un transporteur

tonoplastique d'anthocyanine qui génère une protection contre la lumière UV dans l'endothélium des graines mature, ce qui constituerait une première preuve que les ABCCs de plante sont impliqués dans le transport de métabolites secondaires (Goodman *et al.* 2004).

Les transporteurs ABC sont souvent assujettis à des épissages alternatifs conduisant aux différents transcrits différentiels. Jusqu'à présent, aucun intron U12 n'a été décrit pour les gènes ABC. Les introns de type U12 sont épissés par spliceosome U12, dit «mineur», qui par rapport aux introns conventionnels de type U2, se produisent avec une fréquence très faible (0,35% et 0,17% chez l'homme et *Arabidopsis*, respectivement) (Zhu et Brendel, 2003 ; Alioto, 2007). Par ailleurs, alors que le spliceosome majeur U2 est localisé dans le noyau, le spliceosome mineur U12 réside dans le cytosol où, chez l'homme il est associé au contrôle des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Caceres et Misteli, 2007).

Dans la présente étude publiée dans la revue « journal of Genetics », nous avons identifié la sous-famille des transporteurs ABCC chez *C. roseus* et amorcé la caractérisation d'un membre de cette sous-famille, *CrABCC1*. Une des originalités de cette étude est de décrire la présence de protéines ABC d'homme et de plante dans un même clade phylogénétique. À ce jour, aucune fonction physiologique n'a été attribuée à ces protéines, y compris l'orthologue humain *ABCC10* qui a été caractérisé principalement par son implication dans la résistance aux médicaments anticancéreux (Chen *et al.* 2003 ; Hopper-Borge *et al.* 2004 ; Hopper-Borge *et al.* 2009). D'autre part, chez l'homme *ABCC10* se distingue des autres ABCC par l'existence de deux transcrits codant la région TMD0 (Kao *et al.* 2003), nous avons étudié la séquence codant la région TMD0-CL0 de *CrABCC1* afin de déterminer si une modification similaire soulignant l'épissage alternatif impliquant l'intron U12, existait chez l'orthologue de *C. roseus*. Cette étude pourrait être une piste intéressante mettant en évidence une possible fonction ancestrale commune aux mammifères et aux plantes.

3. Résultats et discussions

3.1. Obtention des ESTs de *C. roseus* et analyse phylogénétique

Un arbre phylogénétique a été généré afin de comparer l'organisation des sous-familles ABCC parmi différents règnes. Comme la sous-famille ABCC est absente chez les procaryotes, seuls les génomes complets de certains organismes eucaryotes sélectionnés parmi les différents règnes animal (homme), végétal (*Arabidopsis*, riz, mousse, *Chlamydomonas*) et

fongique (*Saccharomyces cerevisiae*) ont été intégrés dans l'analyse. En ce qui concerne les séquences ABCC de *C. roseus*, nous avons étudié les ESTs publiquement accessibles sur le site (<http://medicinalplantgenomics.msu.edu>). Nous avons identifié 16 séquences pour *CrABCC1* (tableau 10). Chez les plantes supérieures, les ABCCs sont répartis en trois clades phylogénétiques (Kolukisaoglu *et al.* 2002), au moins une séquence ABCC a été identifiée chez *C. roseus* pour chaque clade (tableau 10, figure 22). A l'exception de PpABCC10 chez *Physcomitrella patens*, nous montrons que cette distribution est conservée aussi chez cette mousse. Les cinq ABCCs de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (Hanikenne *et al.* 2005) n'appartiennent pas à ces clades. Les sous-familles ABCC ont probablement été définies au cours de l'évolution des algues vertes et des bryophytes, puisque que l'analyse du génome de *P. patens* a révélé, déjà, la mise en place des trois clades d'ABCC (Rensing *et al.* 2008) (figure 22). Le clade I est le plus important de point de vue nombre (10/15 ABCCs d'*Arabidopsis thaliana*, 15/17 pour le riz *Oriza sativa*) et 10/15 pour la mousse *P.patens*) et se caractérise par de nombreux événements de duplication (par exemple *AtABCC3/6/7* ou *PpABC8/9/14/15*). A l'exception d'*AtABCC11* et *12*, une extension carboxy-terminale particulière équipe les ABCCs du clade II (Geisler *et al.* 2004). En outre, parce que *PpABCC2*, *3* et *11* possèdent ce motif (figure 23), nous supposons que dans le clade II, *AtABCC11* et *12* ont perdu cette extension au cours de l'évolution tardive des plantes terrestre. Contrairement aux clades I et II qui contiennent exclusivement des ABCCs de plantes, le clade III est le seul comprenant des protéines d'homme et de plantes (figure 22). Deux loci de *C. roseus* appartiennent au clade III, tandis que les autres organismes sont présents en une seule copie : ABCC10 humain, *AtABCC13* d'*Arabidopsis*, *OsABCC12* du riz et *PpABCC1* de *P. patens*. Fait intéressant, dans la publication du génome de la mousse, Rensing *et al.* (2008) soulignent que les peuplements sessiles et la diversité métabolique des plantes terrestres semblent exiger une diversification des protéines ABC. Dans la présente étude, cette hypothèse est confirmée pour le clade I et II mais le clade III semble avoir évolué d'une autre manière, sans duplications de gènes.

	Loci	AAs
Clade III	cra_locus_10644_iso_3_len_3174_ver_3	1014
	cra_locus_15222_iso_1_len_911_ver_3	305
Clade II	cra_locus_6810_iso_3_len_5551_ver_3	1573
	cra_locus_3045_iso_2_len_4637_ver_3	1453
	cra_locus_1250_iso_8_len_5148_ver_3	1436
	cra_locus_1810_iso_6_len_5044_ver_3	1163
	cra_locus_9997_iso_3_len_5150_ver_3	1508
	cra_locus_33335_iso_1_len_3933_ver_3	1259
	cra_locus_18785_iso_1_len_1523_ver_3	452
	cra_locus_14948_iso_1_len_1687_ver_3	529
	cra_locus_16174_iso_2_len_1988_ver_3	664
	cra_locus_87321_iso_1_len_575_ver_3	193
	cra_locus_1763_iso_10_len_5663_ver_3	1621
Clade I	cra_locus_5265_iso_1_len_3763_ver_3	939
	cra_locus_6500_iso_3_len_2549_ver_3	731
	cra_locus_61200_iso_1_len_386_ver_3	129

Tableau 10: Répartition des loci de *CrABCC1* dans les trois clades de plantes.

Les séquences protéiques ont été retrouvées sur le site http://medicinalplantgenomics.msu.edu/integrated_searches.shtml. Les chiffres en gras représentent les références des loci de *C. roseus*. Les longueurs des ESTs sont indiquées avec "len_xxxx". AAs, Longueurs des séquences protéiques codées par les ESTs.

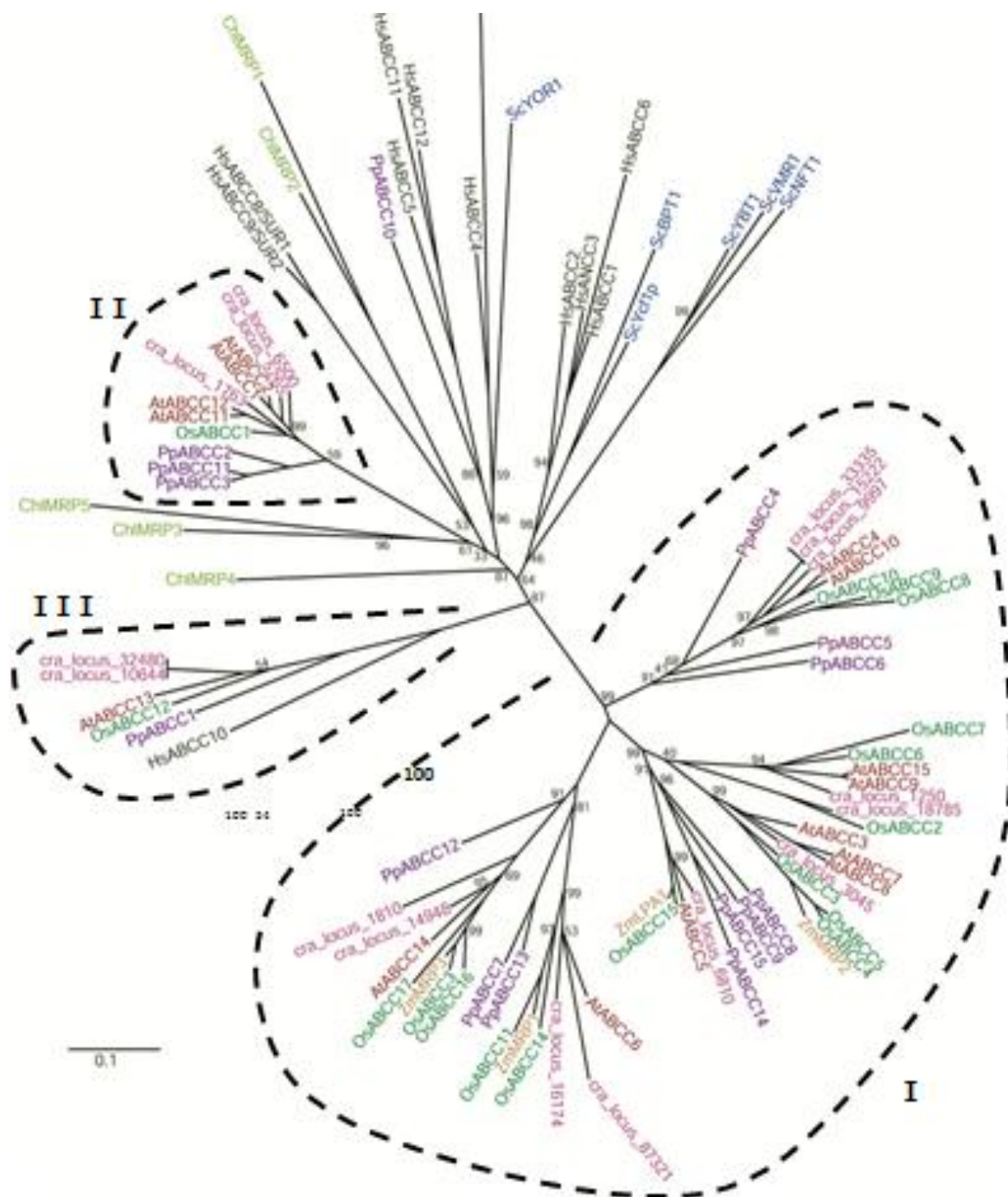


Figure 22: Analyse phylogénétique inter-règnes des transporteurs ABC de type MRP.

Origine des séquences protéiques de MRP utilisées pour les alignements de séquences (ClustalW): *Arabidopsis thaliana* (At), *kolikisaoglu et al.* 2002; riz (Os), *Jasinski et al.* 2003; maïs (*ZmMRP1-3*), *Goodmann et al.* 2004 ; homme (Hs), *Dean et al.* 2001; levure (Sc), *Décottignies et Goffeau*, 1997. *C. reinhardtii* (Chl); *C. roseus* (en rose). Les chiffres romains I, II, III désignent les clades. Cette analyse compare les séquences protéiques déduites des gènes MRPs identifiés dans les génomes entièrement séquencés. Seulement les valeurs de bootstrap différentes de 100 sont indiquées.

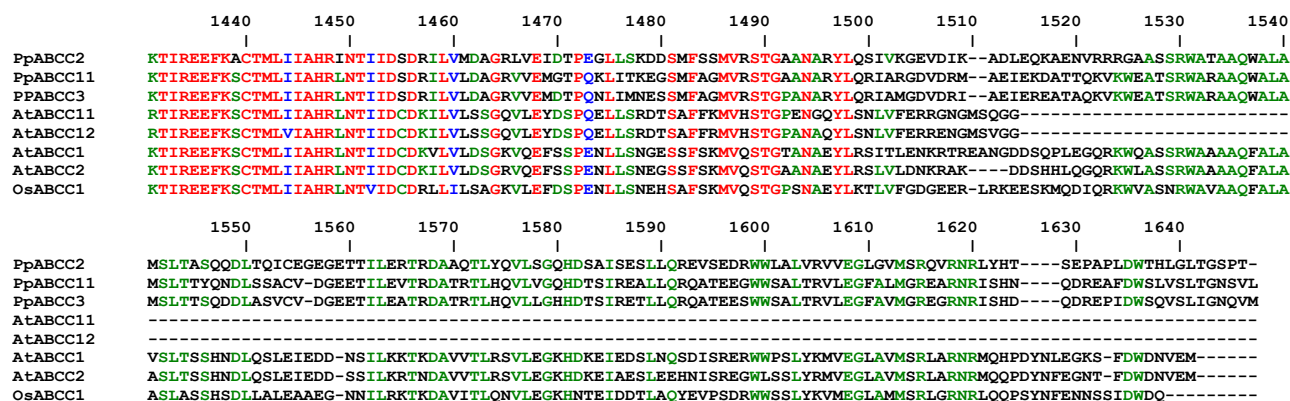


Figure 23: Alignement de séquences de l'extrémité carboxy-terminale des ABCCs appartenant au clade II:

AtABCC11 et AtABCC12 ne possèdent pas l'extension C-terminale de 130 acides aminés.

3.2. Orthologie entre *CrABCC1* de *C. roseus* et *ABCC10* humain

L'existence de deux loci appartenant au clade III chez *C. roseus*, nous a poussés à étudier la possibilité de trouver d'autres homologues. Suite à des alignements de séquences protéiques du clade III, les amorces dégénérées ont été désignées afin d'amplifier par PCR un fragment interne de *C. roseus*, orthologue d'ABCC10. Tout d'abord, la PCR a été réalisée sur l'ADN génomique et montre une bande unique d'environ 2200 pb (figure 24 A). Le clonage et le séquençage des inserts ont révélé une séquence unique. De nouveaux jeux d'amorces spécifiques à *CrABCC1*, couplées à des étapes de 5' et 3' RACE ont été utilisés pour identifier la séquence d'ADNc complète de *CrABCC1* de *C. roseus* (numéro d'accès : AM849475). *CrABCC1* fait 4374 paires de bases et comprend les deux loci non chevauchant identifiés dans les bases de données, que nous avons attribués au clade III (tableau 10). Par ailleurs, le dernier jeu d'amorces au niveau de la 5'-RACE montre l'existence de deux produits PCR (figure 24 B) révélant deux sites d'initiation de la transcription du gène *CrABCC1*. Cet ADNc contient une phase ouverte de lecture (*ORF* : *open reading frame*) codant une protéine dont la taille est prédite à 162764 Da. La prédiction transmembranaire selon le site phobius (<http://phobius.cbr.su.se>) montre que *CrABCC1* possède une topologie standard, typique des ABCCs (figure 24 C), et partage 61.1 (76.1)% et 36.4 (51.6)% d'identité (similarité) de séquence protéique avec AtABCC13 d'*Arabidopsis* et ABCC10 humain, respectivement (tableau 11). La comparaison des séquences des sous-domaines a révélé que NBD2 est le

domaine le plus conservé entre l'homme et *C. roseus*, 49.2 (68.3)% (tableau 11). Cependant, parmi les séquences d'angiospermes, les TMD1 montrent 72.8 (87.8)-78.0 (84.7)% d'identité tandis que les TMD2 montrent 54.0 (62.4)-63.8 (73.2)% respectivement pour *O. sativa* et *A. thaliana*. Outre les six hélices- α transmembranaires qui constituent TMD1 et TMD2 des ABCCs (Tusnady *et al.* 2006), le degré de conservation des acides aminés au niveau des régions TMD1 pourrait être associé à la spécificité de liaison des substrats chez les plantes. La plupart des transporteurs appartenant à la famille ABCC possèdent une extension N-terminal supplémentaire «TMD0» contenant cinq hélices- α transmembranaires (Tusnady *et al.* 2006). Les régions TMD0 de *C. roseus* et d'homme partagent 22.4% d'identité de séquences (tableau 11). Par comparaison aux autres domaines (NBD et TMD), cette faible conservation au niveau des séquences d'acides aminés suggère que les fonctions de TMD0 s'appuient sur des caractéristiques structurales plutôt que des motifs d'acides aminés.

CrABCC1 possède un motif d'acides aminés chargés positivement (figure 24 C), souvent rencontrée au niveau de la première boucle cytosolique des protéines ABCC, et qui pourrait conduire à un clivage post-traductionnelle (Westlake *et al.* 2005). Les domaines NBD sont souvent hautement conservés en comparaison avec les domaines transmembranaires qui sont beaucoup plus diversifiés. En effet, la signature ABC et les Walker A/B présentent des séquences protéiques très similaires entre le clade I (*AtABCC5*), clade II (*AtABCC1*) et du clade III (figure 24 C). *ABCC10* pourrait être un orthologue de *CrABCC1* et des ABCCs de plantes appartenant au clade III. Dans notre analyse phylogénétique le lien d'orthologie est renforcé par une valeur de bootstrap de 100 (figure 22).

Par ailleurs, l'analyse phylogénétique a été réalisée en utilisant la méthode du «maximum de vraisemblance» (*Maximum Likelihood : ML*) considérée comme une méthode de reconstruction phylogénétique particulièrement robuste. Cette approche présente également l'avantage de se placer dans un cadre statistique bien défini qui permet l'étude d'hypothèses alternatives quant aux modalités d'évolution des séquences et aux phylogénies sous-jacentes (Huelsenbeck et Crandall, 1997). Il existe de nombreuses implémentations de cette méthode mais le logiciel PHYML (Guindon et Gascuel, 2003 ; Guindon *et al.* 2005-2009) est le plus rapide et le plus pertinent. Cette méthode qui est la méthode la mieux justifiée sur le plan théorique semble être moins sensible à l'effet d'attraction des longues branches (*Long Branch Attraction effects : LBA*) que la méthode «neighbor-joining».

L'effet LBA concerne des séquences qui présentent peu d'homologies par rapport à un jeu global de séquences plus proches entre elles. Ces séquences éloignées apparaissent alors regroupées ensembles sur l'arbre phylogénétique, sur des longues branches, non pas parce qu'elles se ressemblent entre elles mais parce qu'elles sont très différentes des autres séquences. Afin de clarifier la situation entre les séquences ABCC des différents règnes du clade III, l'effet LBA a été évalué selon la méthode de SAW (Siddal et Whiting, 1999) en générant des arbres phylogénétiques et en excluant successivement *HsABCC10*, *AtABCC13*, *CrABCC1* ou *AtABCC13* et *CrABCC1* (figure 25 B, C, D, et E respectivement). Dans tous les cas, ces séquences sont associées au clade III, ce qui contribue à renforcer le lien d'orthologie entre *HsABCC10* et *CrABCC1* (figure 25).

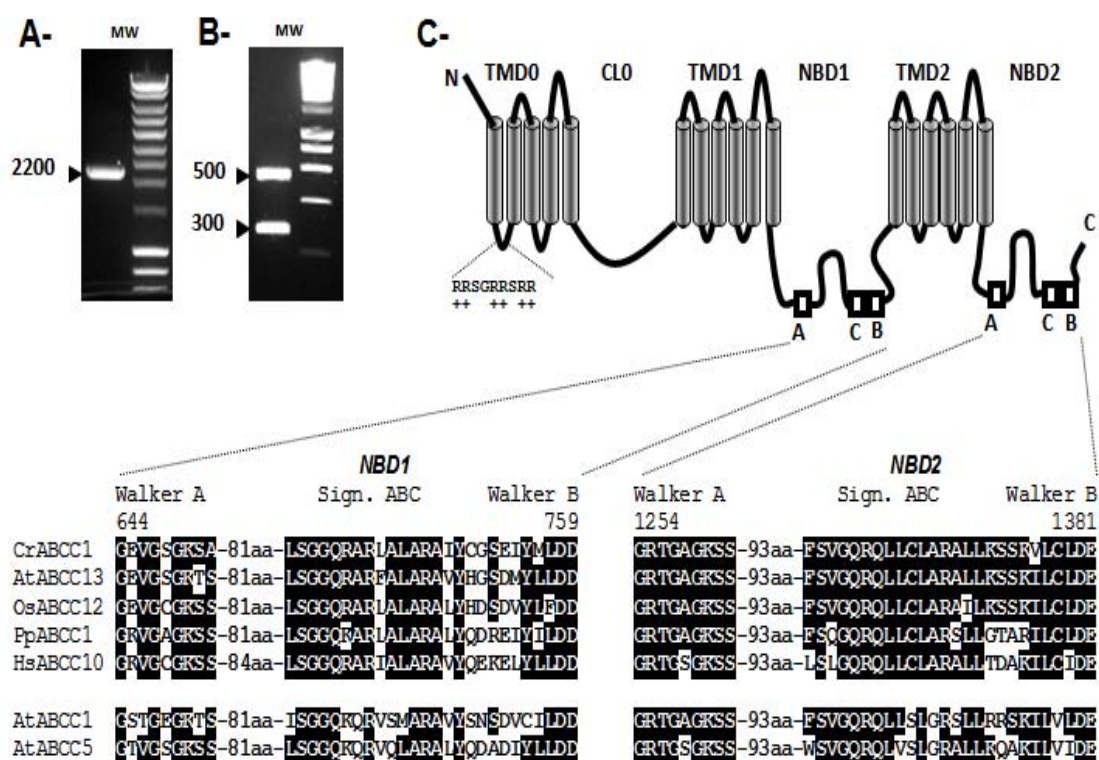


Figure 24: Clonage et caractéristiques de l'ADNc de CrABCC1.

A- Amplification par PCR d'un fragment génomique interne de CrABCC1 en utilisant les amorces dégénérées du clade III. **B-** Amplification du 5' RACE de l'ADNc de CrABCC1. **C-** topologie prédite de CrABCC1; les sous-domaines TMDs, NBDs et CL0 sont indiqués; RRSGRSRR désigne un peptide chargé positivement au niveau de la première boucle cytosolique. La localisation et la comparaison des séquences Walker A (A), B (B), et ABC signature (C) sont affichés. (+ +), Un motif d'acide aminés chargé positivement décrit dans la première boucle cytosolique.

	TMD0	CLO	TMD1	NBD1	TMD2	NBD2	Seq. E
<i>A. thaliana</i>	32.3 (52.7)	34.3 (54.3)	78.0 (87.8)	56.1 (75.2)	63.8 (73.2)	68.6 (78.8)	61.1 (76.1)
<i>O. sativa</i>	32.6 (50.6)	32.7 (57.9)	72.8 (84.7)	55.1 (71.3)	54.0 (62.4)	68.2 (80.0)	57.7 (71.6)
<i>P. patens</i>	5.3 (6.8)	25.9 (47.3)	43.0 (58.5)	45.5 (61.4)	34.4 (48.3)	53.5 (71.8)	38.7 (54.8)
<i>H. sapiens</i>	22.4 (30.1)	16.2 (24.6)	41.7 (61.0)	39.8 (56.4)	33.1 (45.6)	49.2 (68.3)	36.4 (51.6)
AtABCC1 (ClusterI)	15.8 (31.7)	19.8 (32.8)	34.4 (53.6)	39.0 (56.8)	31.2 (49.5)	49.4 (68.3)	29.7 (46.0)
AtABCC5 (ClusterII)	18.2 (28.4)	28.0 (43.2)	27.6 (48.6)	37.6 (57.4)	32.7 (48.7)	44.0 (64.5)	31.4 (48.8)

Tableau 11: Pourcentages d'identité de séquences protéiques des sous-domaines.

Pourcentages d'identité de séquences protéiques des sous-domaines entre CrABCC1 et les ABCCs du groupe I (AtABCC5), groupe II (AtABCC1) et groupe III (*A. thaliana*; *O. sativa*; *P. patens* et *H. sapiens*) en utilisant http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/. Le pourcentage de similitude est indiqué entre parenthèses. Seq E, correspond à une comparaison entre les séquences entières des ABCCs.

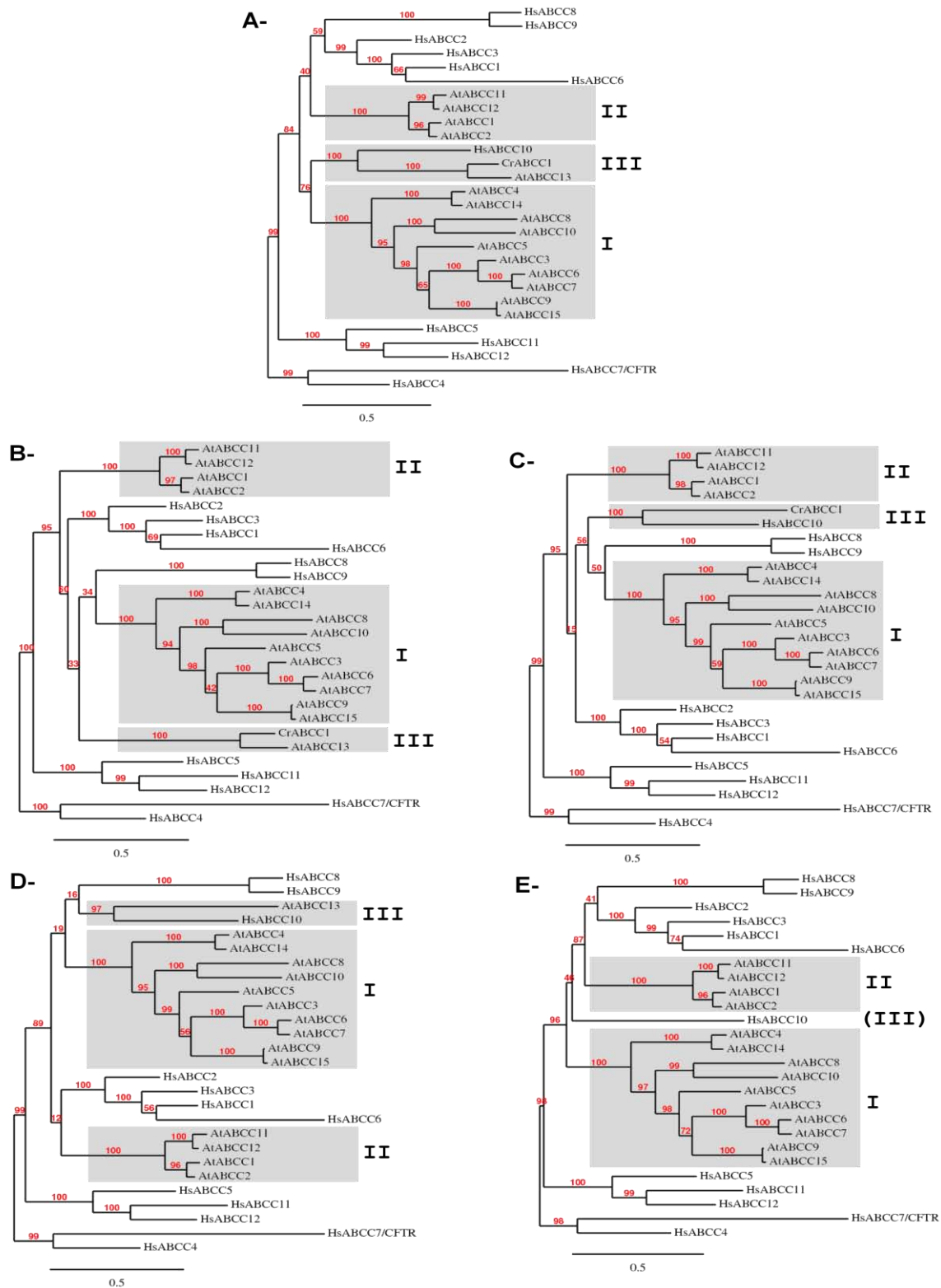


Figure 25: Evaluation de l'effet d'attraction des branches longues.

A- arbre phylogénétique simplifié montré dans la figure 19. B- sans HsABCC10. C- sans AtABCC13. D- sans CrABCC1. E- sans AtABCC13 et CrABCC1. Les chiffres romains indiquent les groupes phylogénétiques décrits dans la figure 19 selon des séquences ABCC d'Arabidopsis.

3.3. Organisation génomique de la séquence codant pour TMD0-CL0 de *CrABCC1*

Deux sites d'initiation de la transcription ont été déterminés pour le gène humain *ABCC10* (Kao *et al.* 2003). Le premier produit un ARN messager codant pour une protéine complète d'*ABCC10* et le second, identifié dans l'intron 2, produit un ARNm codant pour une protéine tronquée d'*ABCC10A* qui lui manque la première hélice transmembranaire de la région TMD0. Chez la souris, l'orthologue d'*ABCC10* (MmMRP7) produit deux principaux ARNm qui codent pour deux protéines complètes ou tronquées comme décrit pour *ABCC10*. Cependant, le mécanisme qui mène à la perte de la première hélice transmembranaire n'implique pas des sites d'initiation de la transcription mais plutôt un phénomène d'épissage alternatif (Kao *et al.* 2002) (figure 26). Afin de déterminer si ces mécanismes sont conservés chez les ABCCs de plantes, nous avons étudié l'organisation génomique du fragment codant pour le TMD0-CL0 chez *CrABCC1* (numéro d'accension de GenBank : HM581933). La comparaison des séquences d'ADNc (895 pb) et d'ADN génomique (2668 pb) a révélé huit exons et sept introns qui diffèrent de l'organisation génomique d'*ABCC10* mais sont identiques à ceux d'*Arabidopsis* et du riz (figure 27 A). Les extensions amino-terminales TMD0 sont formées de cinq hélices aussi bien pour *AtABCC13* et *OsABCC12* (figure 28). Chez la mousse l'extension amino-terminale de *PpABCC1* est codée par huit exons mais aucun emplacement correspondant aux introns de *CrABCC1* n'est conservé (figure 29). Lorsque nous comparons *CrABCC1* avec *AtABCC1* (clade I) ou *AtABCC5* (clade II), aucun emplacement n'est conservé pour les introns dans les séquences génomiques du TMD0-CL0 (figure 27 A). Ces données indiquent que la structure en huit exons de la région TMD0-CL0 est spécifique aux ABCCs des plantes supérieures appartenant au clade III. A l'instar des ABCC de plante appartenant au clade I ou II, les emplacements des introns sont hautement conservés au sein d'un même clade (Kolukisaoglu *et al.* 2002).

L'analyse détaillée de l'extrémité 5' génomique de *CrABCC1* codant pour le TMD0-CL0 a identifié un intron 2 comme étant un intron U12 de type AT-AC, qui est également conservé chez les ABCCs du riz et d'*Arabidopsis* du clade III (figure 27 A, B). Cet intron 2 possède une extrémité 5'-ATATCCTT, une extrémité 3'-AC et une séquence prédite TTCCTTA servant de point de branchement (figure 27 B), qui sont hautement conservés chez les introns U12 (Hall et Padgett, 1994). Tenons compte des modifications accrues au niveau

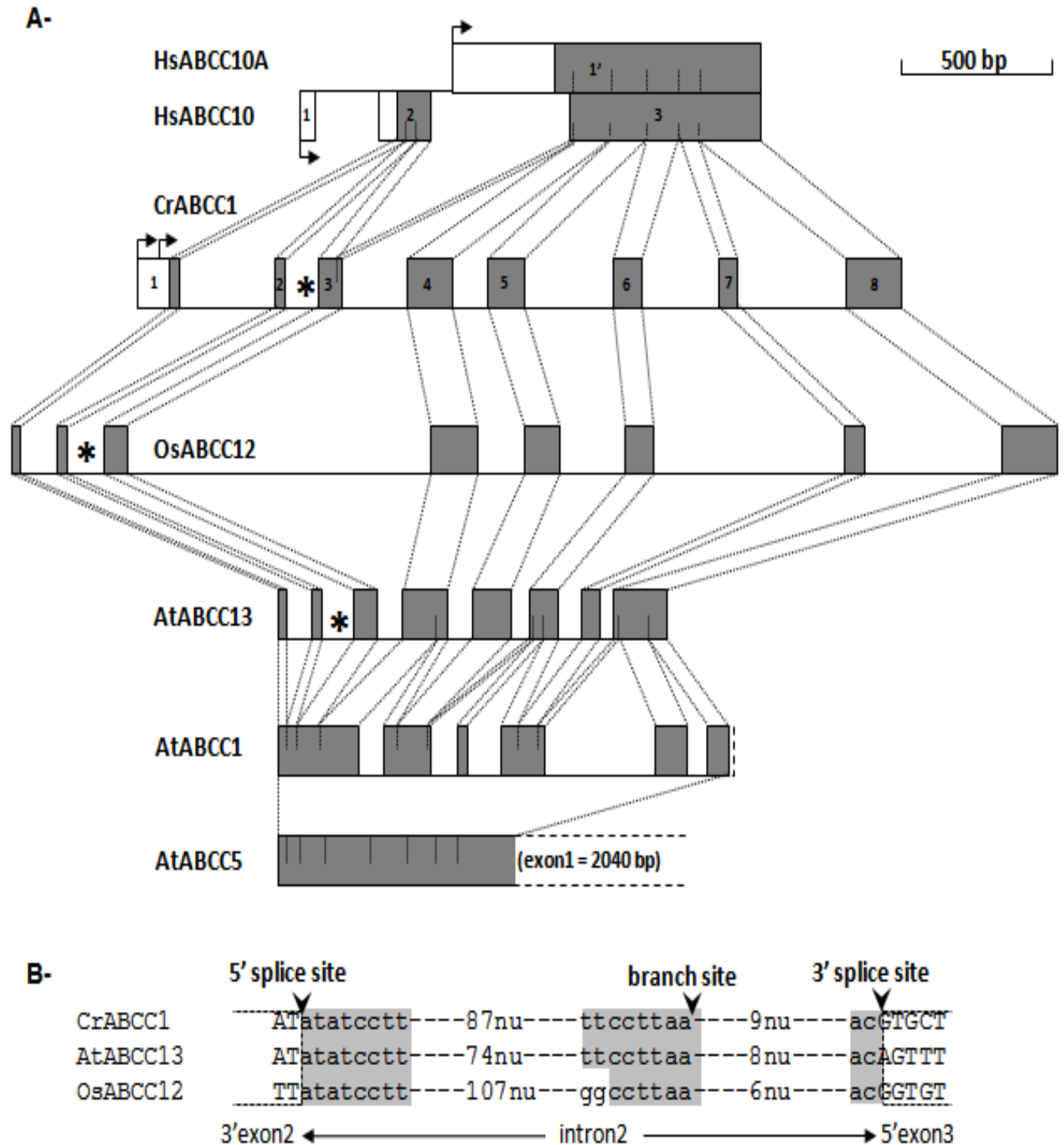


Figure 27: Organisation génomique des fragments codant pour TMD0-CL0.

A- Les exons sont représentés par les rectangles gris. Les cases vides désignent 5'UTR. Les flèches représentent les sites d'initiation de la transcription. (*) Indique l'intron AT-AC de type U12. Les demi-lignes verticales en pointillés, remplacent les introns manquants. **B-** Alignement de séquences des motifs spécifiques de l'intron AT-AC indiqué en (*) dans (A). At (*A. thaliana*), Os (*O. sativa*), Hs (*H. sapiens*), Cr (*C. roseus*).

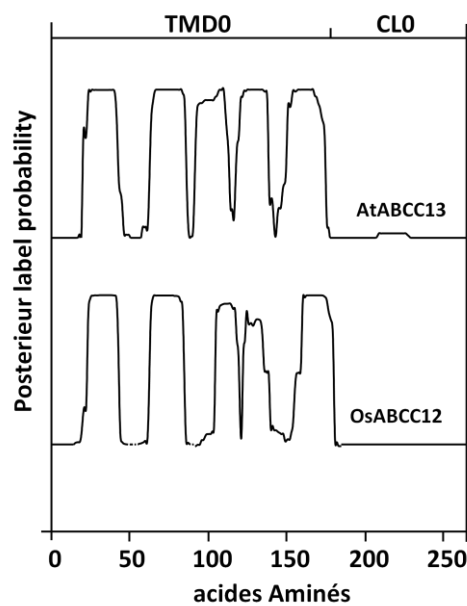


Figure 28: Topologie prédite de la région TMD0-CL0 déduite de la nouvelle annotation d' *AtABCC13* et *OsABCC12* (<http://phobius.cbr.su.se>).

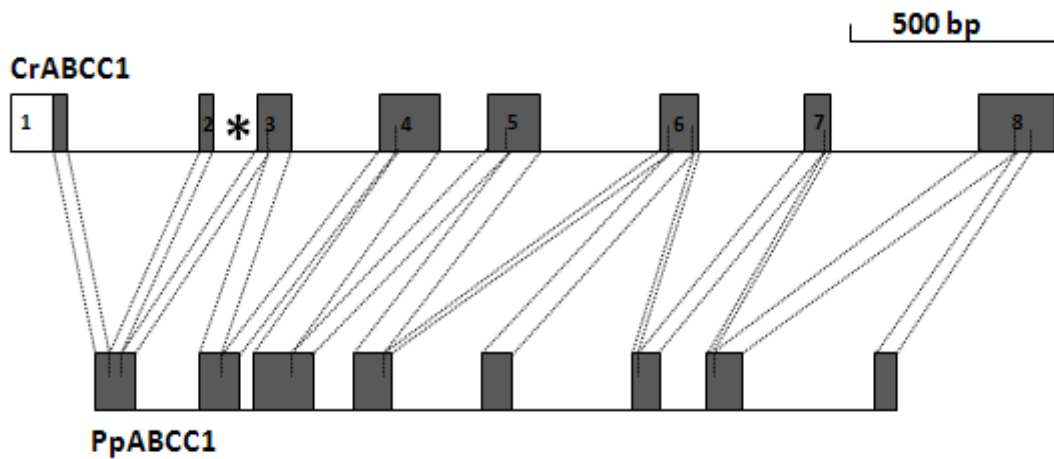


Figure 29: Comparaison de l'organisation génomique de la région TMD0-CL0 de *CrABCC1* et *PpABCC1*.

3.4. Rétention de l'intron U12 de type AT-AC dans les transcrits de *C. roseus*

Afin d'évaluer si l'intron U12 est correctement épissé dans les transcrits de *CrABCC1*, des amorces PCR désignées dans l'exon 1 (comme contrôle) et les introns 1,2,3 couplés à l'amorce *Rev* située dans l'exon 8 ont permis d'amplifier logiquement 4 bandes sur ADN génomique (figure 30 A, ADN_g). Sur ADN_c, l'amorce l'exon 1 couplée à *Rev* amplifie un fragment prévu correspondant à la TMD0-CL0 (figure 30 A, ADN_c). Les PCR ADN_c avec les amorces intron 1, 2,3/*Rev* révèlent que l'intron 2 (836 pb) n'est pas systématiquement épissé alors que les introns 1 et 3 le sont. Comme le montre les RT-PCR semi-quantitative, l'ARN_m avec un épissage correct de l'intron 2 est la forme la plus abondante dans les germinations. Le séquençage des produits PCR, *ATG1/Rev* et *int2/Rev* : 836 pb (figure 30 A, piste [2]) montre également que les introns 4, 5, 6,7 sont épissés mais pas l'intron 2. La présence de 3 codons-stop dans l'intron 2 en phase avec le premier ATG1 (figure 30 B) laisse supposer que lors de l'épissage alternatif, la traduction de *CrABCC1* commencera sur un deuxième ATG identifié sur l'exon 3 (figure 30 B).

Parce que l'exon 3 code pour la première hélice transmembranaire prédite (figure 30 B), la topologie de TMD0-CL0 a été évaluée avec le deuxième ATG en tant que premier codon. Selon la prédiction du site PHOBIUS, lorsque la traduction commence par le codon ATG alternatif, *CrABCC1* (dit *CrABCC1A*) et *ABCC10A* montrent une topologie similaire caractérisée par la perte de la première hélice transmembranaire (figure 30 C). De cette façon, la conservation des formes alternatives tronquées est bien prouvée aussi bien chez l'homme, la souris ainsi que chez *CrABCC1*. Par ailleurs, *CrABCC1* et *PpABCC1* partagent 54,8% de similarité de séquence. Cependant, l'homologie au niveau des TMD0 diminue considérablement à 6,8% (30,1% entre l'homme et *C. roseus*) (tableau 11). La prédiction de la topologie des protéines transmembranaires révèle que l'extrémité amino-terminale de *PpABCC1* ne possède pas de domaines transmembranaires, comme le montre la figure 30 C. L'absence du domaine TMD0 typique des ABCCs chez *PpABCC1* suggère que le corps du transporteur «TMD1-NBD1-TMD2-NBD2» est suffisant pour assurer l'activité de transport chez la mousse *P. patens*. Jusqu'à présent, les fonctions de TMD0 restent floues, cependant les données moléculaires découplent partiellement ce domaine du processus de transport. Par exemple chez l'homme, la suppression du domaine TMD0 d'ABCC1/MRP1 n'a aucune influence sur la fonction de transport, mais altère son trafic à la membrane plasmique (Westlake *et al.* 2005). D'autres études ont montré que le ABCC2/MRP2 humain dépourvu de

la TMD0 est associé à un compartiment intracellulaire et que sa localisation à la membrane plasmique est restauré avec la co-expression de son TMD0 (Fernandez *et al.* 2002). En outre, ABCC8/SUR1 (*Sulfonyl Urée Receptor 1*) qui est un modulateur de canaux potassiques sensibles à l'ATP (càd K_{ir}6.2), agit au travers d'interactions protéine-protéine qui engagent la région TMD0-CL0 (Chan *et al.* 2003).

La conservation des formes alternatives tronquées de TMD0 entre les plantes supérieures et les mammifères (càd CrABCC1/HsABCC10) suggère l'importance de cette particularité peut être vis-à-vis du trafic intracellulaire des protéines et/ou d'interactions protéine-protéine.



Page 98 | 214

3.5. La localisation tonoplastique du TMD0-CL0 nécessite la 1^{ère} hélice transmembranaire

Les localisations subcellulaires de la région TMD0-CL0 de CrABCC1 et de la forme délétée de la première hélice α transmembranaire TM1 (prédite pour CrABCC1A, figure 30 C) ont été évaluées par imagerie YFP (Yellow Fluorescent Protein). Une cinétique d'observation sur 48 heures a été réalisée sur des protoplastes transfectés avec une construction moléculaire codant pour la protéine de fusion TMD0-CL0-YFP. Les résultats indiquent que 6 heures après la transfection, la fluorescence correspond principalement à des points au niveau du cytoplasme (figure 31, 6h). Après 24 heures la protéine se localise au niveau des segments transvacuolaires et sur le pourtour cellulaire (figure 31 24h). Enfin après 48h, la cinétique s'achève sur une localisation au tonoplaste (figure 31, 48h).

Le profil d'expression du TMD0-CL0-YFP a été affiné et comparé à celui de la construction délétée pour la région codant la TM1, commençant par le 2^{ème} ATG déterminé figure 30 B. Les protoplastes de *C. roseus* présentent une grande vacuole (coloration rouge neutre) et un noyau visible (figure 32 A). La YFP exprimée de manière transitoire dans les protoplastes de *C. roseus* montre la localisation nucléaire et cytoplasmique connue (figure 32 B, C). L'observation en microscopie à épifluorescence des protoplastes transfectés avec la construction codant pour la protéine de fusion sans troncation ([1-267] TMD0-CL0-YFP) révèle une localisation tonoplastique (figure 32 D). La localisation de la protéine sans la TM1 ([35-267] TMD0-CL0-YFP), apparaît sous forme de vésicules autour du noyau (figure 32 E). Les vésicules non identifiées peuvent correspondre à des structures dérivées du réticulum endoplasmique/appareil de Golgi ou à des vésicules, provenant des compartiments prévacuolaires et résultant d'un mauvais acheminement de la protéine de fusion tronquée. Cependant, même si nous ne pouvons pas exclure une localisation artéfactuelle en raison de la nature hydrophobe de la protéine [35-267] TMD0-CL0-YFP surexprimée par le promoteur 35S, nous notons que la plupart des protoplastes transfectés avec les constructions [1-267] TMD0-CL0-YFP, montrent la même localisation tonoplastique illustrée dans la figure 32 D.

Les transporteurs ABCC sont localisés dans les membranes plasmiques ou au tonoplastes et contribuent au transport des métabolites secondaires à travers ces membranes. Chez la levure, Ycf1p est un ABCC tonoplastique impliqué dans la séquestration du cadmium (Li et al. 1996) et son peptide TMD0, exprimé seul, est également localisé à la membrane vacuolaire (Mason et Michaelis, 2002). Jusqu'à présent, la plupart des ABCCs de plantes ont été localisés au tonoplaste ; les vacuoles sont en effet des voies alternatives pour les processus

de détoxification (Martinoia et al. 1993 ; Geisler et al. 2004 ; Goodman et al. 2004 ; Nagy et al. 2009 ; Wojas et al. 2007). En outre, l'étude protéomique de la vacuole d'*Arabidopsis* a identifié des peptides tryptiques correspondant à la protéine AtABCC13 (Jacquinod et al. 2007).

A la lumière de ce qui précède et avec la localisation de TMD0-CL0 de CrABCC1 au tonoplaste, nous pouvons suggérer que les ABCC de plantes, orthologues d'ABCC10 peuvent être des transporteurs tonoplastique. La localisation subcellulaire d'ABCC10 n'est pas assez documentée à ce jour, mais la plupart des MRP/ABCCs humain sont localisés dans la membrane plasmique (Zhang et al. 2004). Les signaux d'adressage au plasmalemm et au tonoplaste restent incertains ; par exemple, l'expression hétérologue du MRP1/ABCC1 humain dans le tabac a montré une localisation tonoplastique où la protéine fonctionnelle confère une tolérance aux métaux lourds dans les cellules transgéniques (Yazaki et al. 2006). Les significations fonctionnelles des transcrits alternatifs de CrABCC1, d'ABCC10 et les conséquences sur le trafic subcellulaire des protéines restent floues. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que la mauvaise localisation de la protéine tronquée de *C. roseus* pourrait être liée à un processus de régulation post-transcriptionnelle qui implique l'intron U12. En effet, la forme canonique du TMD0 expose la partie N-terminale du côté extra-cytosolique (apoplaste ou lumen vacuolaire). Nous suggérons que l'absence du TM1 due à la rétention de l'intron U12 pourrait produire une protéine ABC mal repliée et qui n'est pas sujette à des activités de transport.

Afin de valider ou invalider la localisation tonoplastique de CrABCC1 nous avons essayé de déterminer la localisation subcellulaire du transporteur complet.

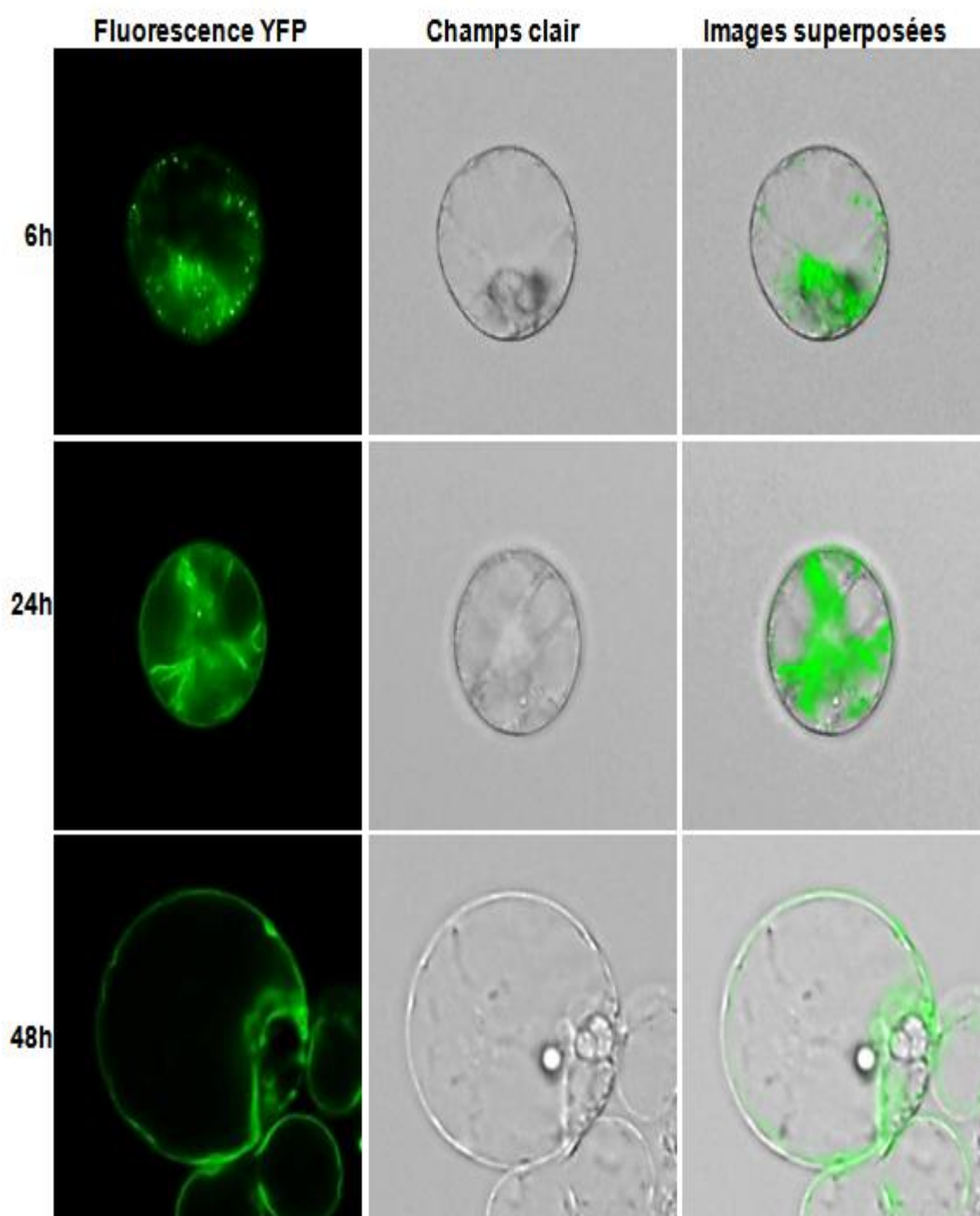


Figure 31: Cinétique de la transfection des protoplastes avec la construction 35S: [0-167] TMD0-CL0-YFP.

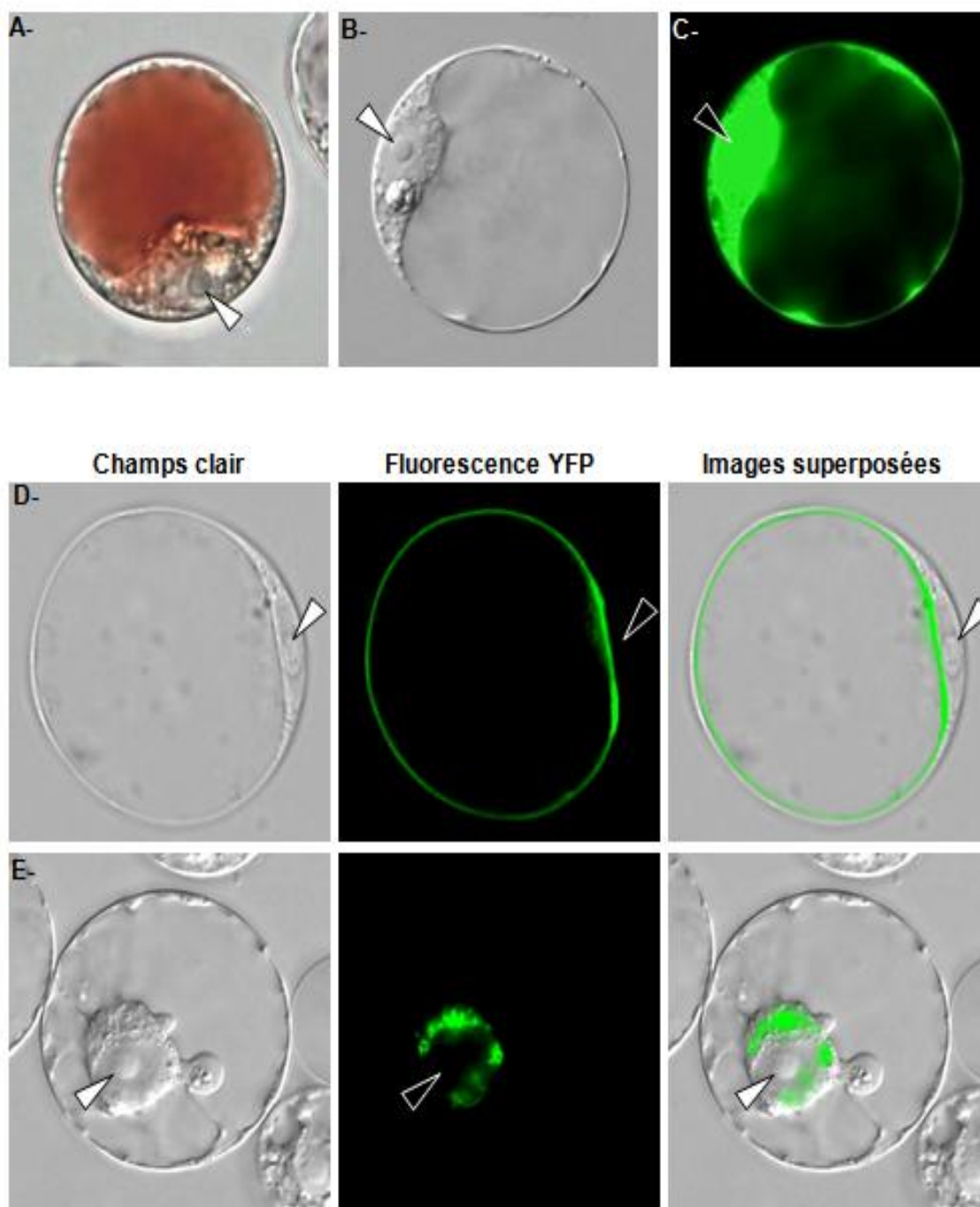


Figure 32: Localisation subcellulaire des variants de TMD0-CL0 fusionnés à la YFP

Les flèches indiquent l'emplacement du nucléol dans le noyau. **A-** Image en champ claire d'un protoplaste de *C. roseus* avec la vacuole colorée au rouge neutre. **B-** Image au champ claire d'un protoplaste transfecté avec un vecteur d'expression contenant la construction 35S::YFP. **C-** Fluorescence YFP de l'image B. **D-** transfection de protoplaste avec la construction 35S::[1-267]TMD0-CL0 fusionnée à la YFP. **E-** transfection de protoplaste avec la construction 35S::[35-267]TMD0-CL0 fusionnée à la YFP.

3.6. Localisation subcellulaire de CrABCC1

La stratégie de localisation de CrABCC1 choisie est l'imagerie GFP. Cette approche nécessite le clonage de l'*orf* complète de CrABCC1 qui doit ensuite être fusionnée à l'*orf* d'une protéine fluorescente (ici, la GFP, *green fluorescent protein*), le tout placé dans un vecteur possédant une cassette d'expression de gène de plante (càd promoteur et terminateur de transcription). Cependant, l'approche par transfection de protoplaste est limitée par la taille du vecteur utilisé pour la transfection (ici près de 10 Kb). C'est pourquoi, l'introduction de la construction CrABCC1-GFP dans les cellules végétales sera réalisée par l'intermédiaire de la bactérie *Agrobacterium*.

Le clonage de CrABCC1 complet s'est avéré difficile. Dans un premier temps, plusieurs tentatives de *TA-cloning* (pGEM T-Easy) des produits de RT-PCR de l'*orf* CrABCC1 ont échoué. Malgré l'utilisation de polymérase à ADN avec activité *Proof reading*, les séquences obtenues sur les quelques clones recombinant obtenus présentaient de forts taux de mutation (1-1.5%) ainsi que des délétions de plusieurs nucléotides dans l'*orf*. Ce qui signifie que la séquence de CrABCC1 pourrait être toxique pour *E. coli* ou bien que le faible niveau d'expression possible avec le promoteur *lacZ* du vecteur pGEM T-Easy sans induction (IPTG), produirait une protéine toxique pour la bactérie.

Par la suite, afin de limiter les étapes de clonage, l'*orf* CrABCC1 a directement était cloné en dans un vecteur d'expression de plante (pBi) (figure 33). Pour l'observation microscopique, le gène de la GFP a été introduit dans la phase de lecture en 3' de CrABCC1 de façon à suivre l'expression de la protéine par fluorescence et identifier sa localisation subcellulaire ; ce système peut fonctionner en expression transitoire via l'agrotransformation. Dans cette approche aussi, l'ADN plasmidique s'est révélé instable dans les bactéries *E. coli* et *Agrobacterium*. Les profils de restriction obtenus après transformations bactériennes se révélaient complexes et suggéraient des évènements de recombinaison dans le plasmide.

Malgré l'instabilité des constructions moléculaires, quelques expériences de localisation subcellulaires ont été menées. Dans une première approche, la protéine de fusion a été exprimée dans des cellules C20D de *C. roseus* co-cultivées avec les *Agrobacterium* portant la construction CrABCC1-GFP. Les premières observations au microscope à épifluorescence de CrABCC1 fusionné à la GFP sont effectuées au bout de 48 heures. La co-cultivation C20D avec *Agrobacterium* portant la GFP seule donne des bons niveaux

d'expression (figure 34 A, B) et de bons taux de transformation (figure 34 C, D). Les résultats obtenus avec la construction CrABCC1-GFP sont plus difficilement interprétables. Le taux de transformant est très faible ainsi que le niveau de fluorescence observé. L'image présentée figure 34 E, F est une des rares cellules fluorescentes observée avec cette construction et pourrait à un adressage au plasmalemme. Cependant, le faible taux de transformants et l'instabilité des vecteurs constatés ne permettent pas d'affirmer avec certitude qu'il s'agisse de la fluorescence de la protéine de fusion CrABCC1-YFP. Par ailleurs, on ne peut pas exclure non plus que la fluorescence observée ne soit pas due à l'auto-fluorescence des parois cellulaires qui sera augmentée par la présence de bactéries qui stimulent les réactions de défense de la plante et l'accumulation de composés fluorescents.

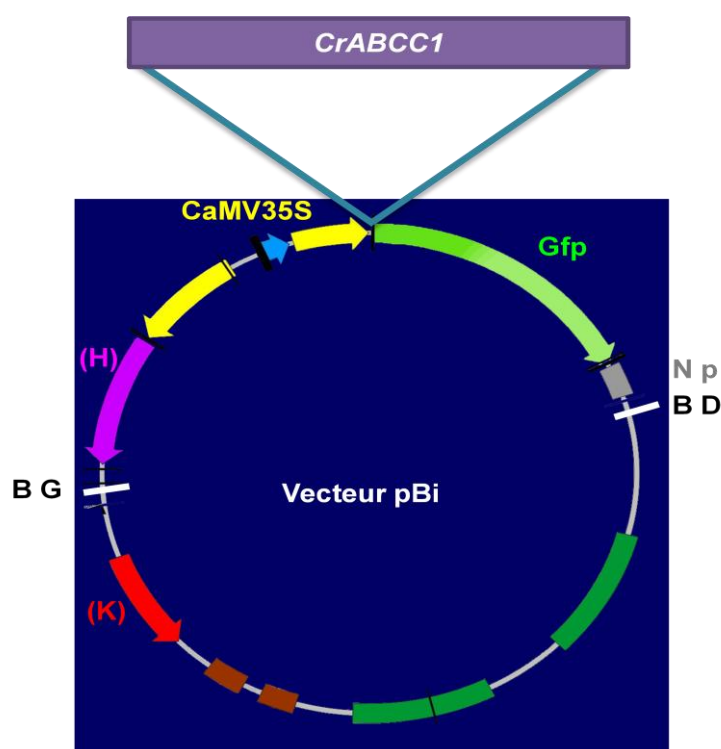


Figure 33: clonage du CrABCC1 en entier dans le vecteur pBi.

GFP, Green Fluorescent Protein. H: hygromycine, K: Kanamycine, BG: bordure gauche, BD: bordure droite, N p: Nos polyA.

L'expérience a ensuite été menée avec un système d'expression transitoire plus robuste qui consiste à infiltrer la partie inférieure des feuilles de tabac par la solution d'*Agrobacterium* portant la construction d'intérêt. L'infiltration réalisée avec la construction GFP seule révèle un marquage nucléocytosolique de quelques cellules de l'épiderme. (figure 35 A). Avec la construction CrABCC1-GFP, on observe une fluorescence sur le contour des cellules que l'on peut associer au plasmalemmes. Cependant ici, toutes les cellules épidermiques semblent avoir été transformées et présentent le même profil de fluorescence (figure 35 B). En utilisant une construction d'un marqueur du plasmalemmes fusionné à la GFP (PMA2-GFP, *Plasmamembrane H⁺-ATPase 2*, don du Pr Boutry, Université Catholique de Louvain), on observe un profil de fluorescence plus intense et des cellules transformées parsemées sur l'épiderme (figure 35 C). Enfin, l'infiltration des feuilles de tabac réalisée avec une culture d'*Agrobacterium* non transformée, présente un profil comparable à celui obtenu avec la construction CrABCC1-GFP (faible fluorescence pour toutes les cellules de l'épiderme, figure 35 D). Ici aussi, l'approche menée ne permet pas de conclure précisément sur la localisation subcellulaire de CrABCC1.

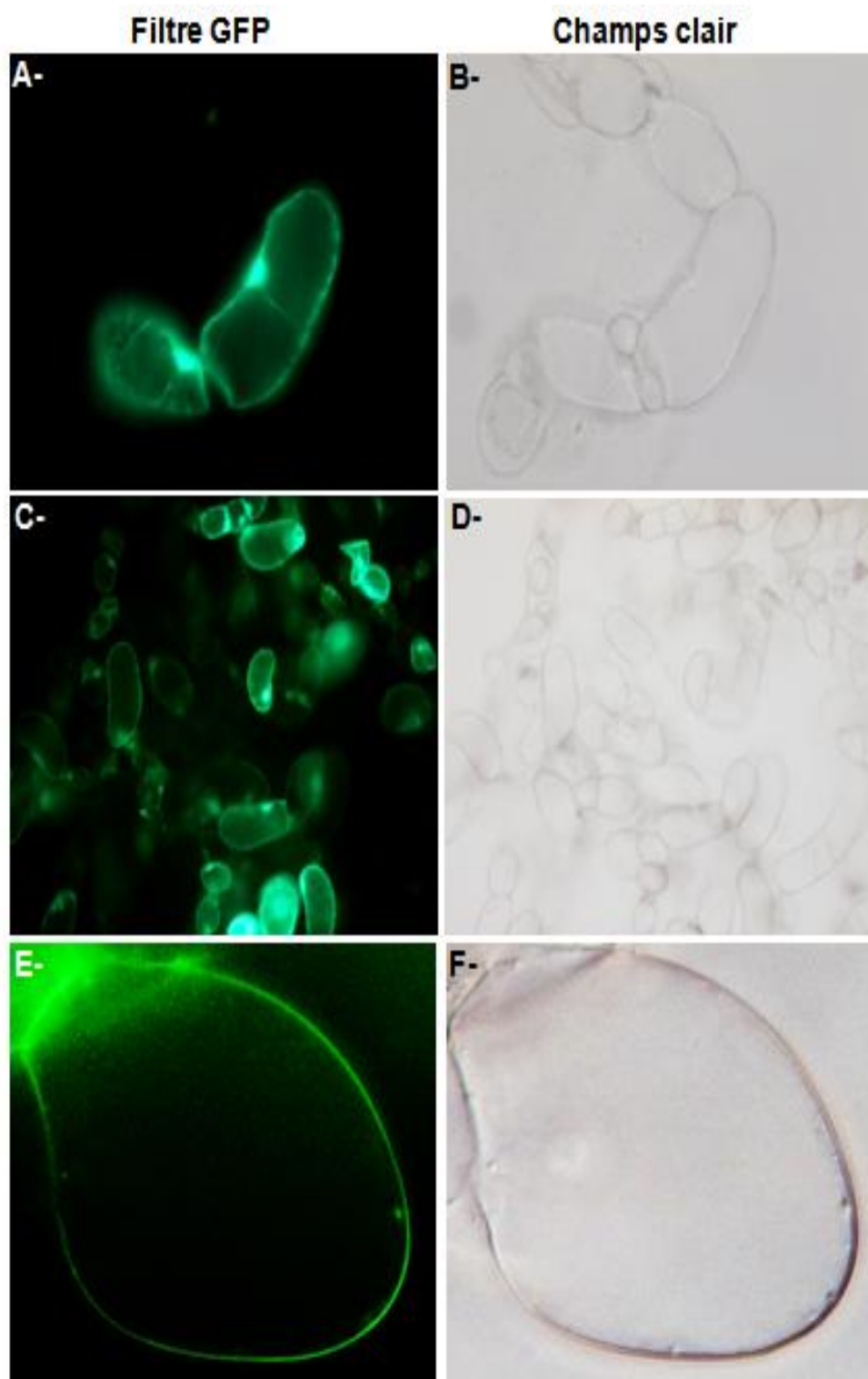


Figure 34: Co-cultivation des cellules C20D avec Agrobactérium et la construction CrABCC1-GFP.

A, B- détail d'un profil classique de la GFP qui consiste en un marquage du noyau et du cytosol. **C, D-** Profil GFP: efficacité de la transformation. **E, F-** CrABCC1 fusionné à la GFP. Observation effectuée au bout de 48 heures de co-cultivation.

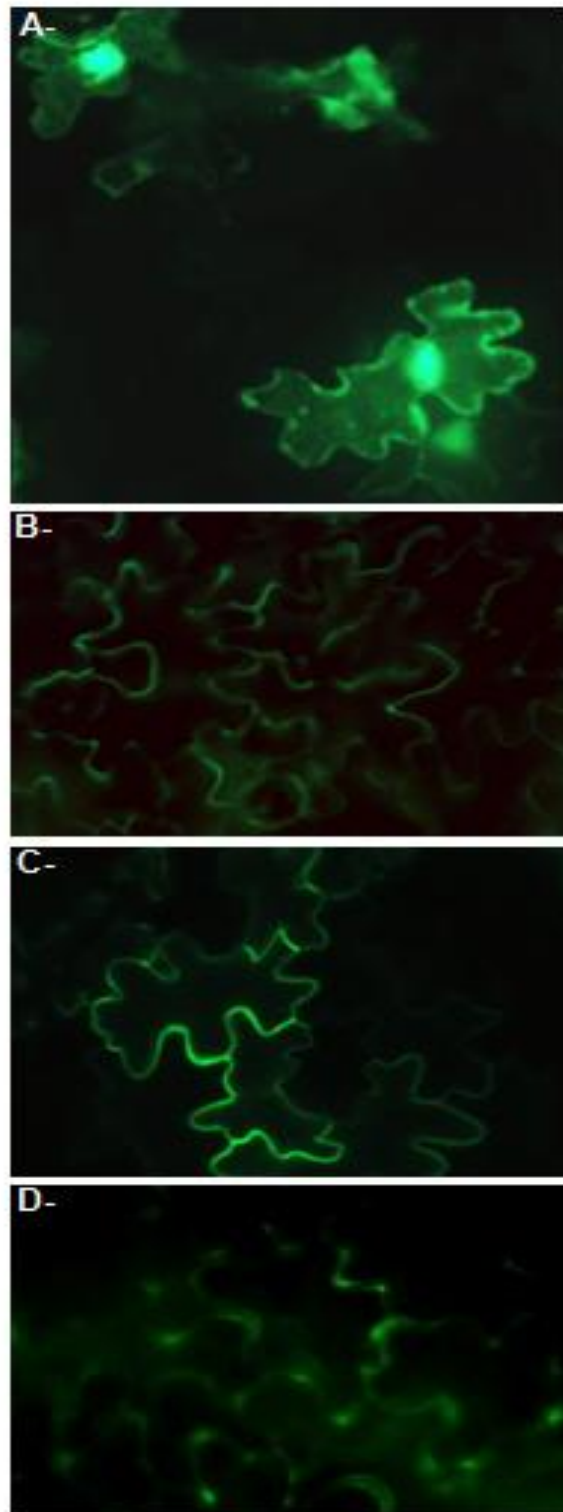


Figure 35: Infiltration de feuilles de tabac avec *Agrobacterium* contenant la construction CrABCC1-GFP.

A- Profil GFP seule. **B-** Profil de CrABCC1-GFP. **C-** Profil de PMA2-GFP. **D-** Autofluorescence des cellules non-transformées après argo-infiltration.

Les deux techniques, de co-cultivation avec *Agrobacterium* dans les cellules C20D ou d'infiltration dans les feuilles de tabac, montrent quelques insuffisances inhérentes à la manipulation et qui sont pour la plupart dues à l'instabilité des vecteurs dans les bactéries et l'autofluorescence des parois végétales accrues par les bactéries, ce qui apporte une ambiguïté dans l'interprétation des résultats. Pour ces raisons, de façon à limiter les effets liés à *Agrobacterium* nous avons eu recours à la transformation transitoire par biolistique sur des cellules C20D. Ici, l'ADN du vecteur préparé à partir de culture d'*E. coli* est fixé sur des microbilles métalliques et directement introduit dans les cellules par bombardement sur des tapis de cellules C20D. Le signal émis par la construction CrABCC1-GFP au bout de 24 heures montre un marquage dense autour du noyau et des segments transvacuolaires ; l'observation en détail montre un réseau fluorescent intriqué pouvant correspondre au réticulum endoplasmique (figure 36, 24h). Après 48 heures, la protéine de fusion CrABCC1-GFP semble avoir transité lentement vers le tonoplaste (figure 36, 48h). Ces résultats semblent indiquer que CrABCC1 serait associé au tonoplaste, comme la plupart des transporteurs ABCC décrits à ce jour. Cependant, le peu de reproductibilité des résultats obtenus ici par la biolistique (peu de transformant et souvent un marquage du réticulum maintenu à 48h) ne permettent pas de conclure avec certitude quant à la localisation tonoplastique de CrABCC1 et nécessiterait des expériences complémentaires. En effet, tout comme AtMRP6/ABCC6 d'*Arabidopsis* (Gaillard *et al.* 2008), nous avons souligné les difficultés de stabilité des constructions moléculaires contenant l'*orf* complète de *CrABCC1*. Nous pensons que ces transporteurs avec leur extension N-terminale se révèlent toxiques pour les cultures d'*E. coli* utilisées ici pour les préparations d'ADN plasmidique nécessaires dans l'approche biolistique.

Toutefois, l'ensemble des résultats obtenus (localisation TMD0-CL0, biolistique CrABCC1) et le fait que les approches protéomiques aient identifiées l'orthologue de CrABCC1 chez *Arabidopsis* (AtABCC13) dans le tonoplaste (Jacquinod *et al.* 2007), suggèrent fortement que CrABCC1 est un transporteur ABCC du tonoplaste et que son adressage correct implique la présence de la 1^{ère} hélice α transmembranaire du TMD0. Alors que nous avons pu établir que HsABCC10 et CrABCC1 sont des orthologues, qu'ils possèdent donc en commun le même gène ancestral, si l'on peut s'attendre à des propriétés enzymatiques communes, ces deux protéines ne semblent pas être localisées dans le même compartiment subcellulaire.

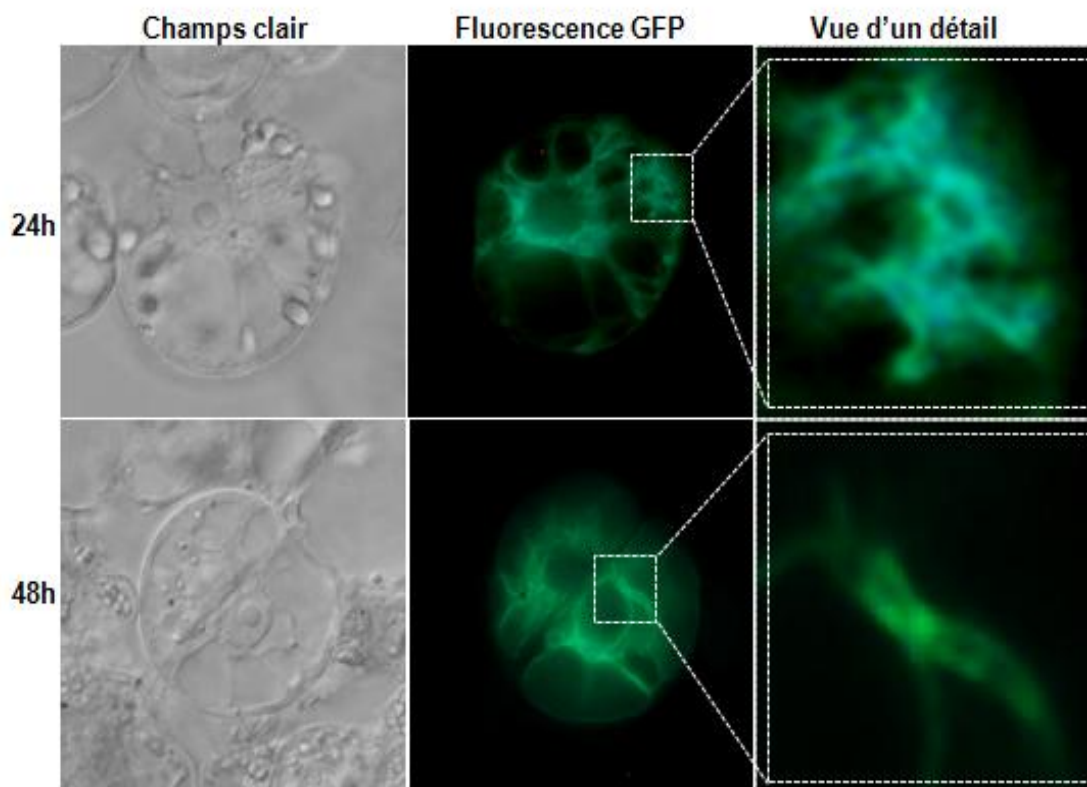


Figure 36: Expression transitoire par biolistique sur cellules C20D avec la construction CrABCC1-GFP.

Observation au microscope à épifluorescence 24 et 48 heures après les tirs. La colonne de droite montre un détail d'une région fluorescente au niveau du réticulum endoplasmique (24h) ou de segments transvacuolaires (48h).

3.7. Evaluation du profil d'expression de CrABCC1

Les ressources génomiques des plantes médicinales offrent une large gamme de données sur leur transcriptome (medicinalplantgenomics.msu.edu/). Nous avons étudié les valeurs de FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) pour les deux *loci* de *C. roseus* correspondant à *CrABCC1* (figure 37 A). D'après les résultats, *CrABCC1* est largement exprimé dans les organes de la plante, les chevelues racinaires (*hairy root*) et à un niveau plus faible dans les cultures cellulaires (figure 37 B). Les racines et les tiges montrent les valeurs de FPKM les plus élevées, respectivement 17 et 14, tandis que les autres organes sont entre 3 (fleur) et 6 (germination). Fait intéressant, l'expression de *CrABCC1* est modulée négativement par le méthyl jasmonate chez les plantes sauvages (WT)

et dans les chevelues racinaires interférés pour la TDC (tryptophane décarboxylase, *TDCi*). Les traitements au méthyl jasmonate ou par des éliciteurs (*Yeast extract*) ne modifient pas l'expression de *CrABCC1* en suspension cellulaires ou dans les germinations (seulement méthyl jasmonate testé). Ceci suggère que la régulation négative de *CrABCC1* par le méthyl jasmonate est organe-dépendante.

En outre, l'interférence de la TDC, l'enzyme qui catalyse la dernière étape de la voie des indoles par la synthèse de tryptamine (Ziegler et Facchini, 2008), ne modifie pas le niveau d'expression de *CrABCC1*. Parce que la tryptamine se compose du noyau indolique des AIM, nous pensons que la fonction physiologique de *CrABCC1* chez *C. roseus* n'est pas directement liée à la biosynthèse des AIM, mais plutôt à une fonction commune aux plantes et aux mammifères.

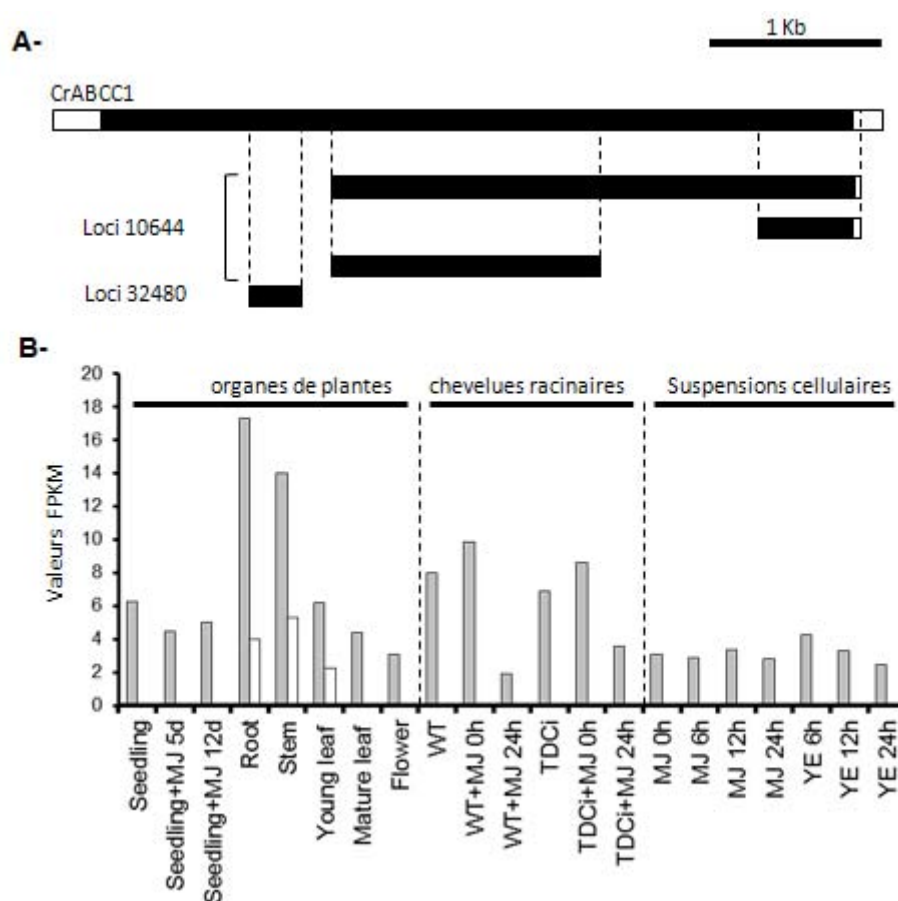


Figure 37: L'analyse des données d'expression des valeurs FPKM de *CrABCC1*.

A- Localisation des loci correspondants à *CrABCC1* récupérés des ressources génomique des plantes médicinales (MPGR). **B-** Représentation des valeurs FPKM de *CrABCC1* à partir de la base de données MPGR. MJ, méthyl jasmonate; YE, extrait de levure; TDCi, tryptophane décarboxylase interféré; d, jour.

3.8. Répartition des ABCCs du clade III parmi les eucaryotes

La présence des ABCCs du clade III a été étudiée dans différents organismes sélectionnés en fonction de leur pertinence par rapport à l'évolution des eucaryotes. Les séquences nucléotidiques des homologues d'ABCC10 ou de CrABCC1 ont été récupérées suite à l'analyse génomique par BLAST (Altschul *et al.* 1990), ensuite les orthologues du clade III ont été identifiés par des analyses phylogénétiques (tableau 12, figure 38). Dans le règne animal : les vertébrés, les insectes et les cnidaires (méduse : jelly fish) présentent une seule séquence. Pas d'orthologues identifiés chez les nématodes, soulignant la divergence des ABCCs du clade III au sein du règne animal (figures 38, 39 A). Toutefois, le choanoflagellé *Monosiga brevicollis* qui est décrit comme l'ancêtre commun des animaux (King *et al.* 2008), possède un orthologue d'ABCC10 (figures 38, 39 A). L'absence du clade III chez *C. elegans* (Sheps *et al.* 2004) implique une perte indépendante du gène dans ce phylum et indique que la fonction physiologique des orthologues d'ABCC10 n'est pas nécessaire pour les nématodes ou peut être en quelque sorte compensée par d'autres processus spécifiques aux vers ronds. Selon notre analyse, aucun orthologue d'ABCC10 n'a été identifié dans le règne fongique (figures 38, 39 A). Étonnamment, aucun orthologue n'a été identifié dans les génomes d'algues vertes (*C. reinhardtii* et *O. lucimarinus*) (figures 38, 39 A). Depuis que les algues vertes sont considérées comme ancêtres des plantes terrestres, on peut soupçonner encore une fois qu'une perte indépendante des gènes orthologues d'ABCC10 a eu lieu après la séparation des algues vertes et des plantes terrestres. Le clade III des ABCCs est également absent chez l'algue rouge *C. merolae* (Hanikenne *et al.* 2005). Concernant les algues, on peut toutefois noter que les génomes complets considérés ici ne concernent que des organismes unicellulaires. On remarque en effet, que les orthologues d'ABCC10 sont présents dans les organismes végétaux et animaux complexes.

Un aperçu sur les alignements des séquences d'acides aminés des ABCC du clade III révèle un peptide hautement conservé (figure 39 B) localisé dans la boucle cytosolique entre les hélices transmembranaires 13 et 14. Parmi les vingt acides aminés, deux sérines potentiellement phosphorylées sont prédites dans les motifs conservés NRFSSD et DDSLPF ; ces motifs sont potentiellement phosphorylables par une Phospho-kinase A (PKA) et protéines de contrôle de la division cellulaire 2 (*cdc2* : *cell division control protein 2*), respectivement (NetPhosK 1.0 server ; Blom *et al.* 2004). Les alignements de séquences générés pour l'analyse phylogénétique des ABCCs ont révélé que le motif NRFSSD se retrouve également

chez « Bpt1p » de la levure et au niveau des séquences du *récepteur* des *sulfonylurées* humain « SUR1 » tandis que le motif DDSLPF appartient exclusivement au clade III (données non présentées). Alors que les Walker A, B et la signature ABC sont conservés parmi toutes les protéines ABC, le peptide de 20 résidus identifiés ici définit une signature spécifique des ABCC du clade III. La présence du peptide de 20 acides aminés exclusivement chez les ABCCs du clade III est compatible avec le lien d'orthologie identifié au travers l'analyse phylogénétique dans la figure 22.

Régne	Embranchement	Nom commun	Nom binominal	Orthologue	Accession ^a
Animal	Vertebrates	Human	<i>Homo sapiens</i>	1	NP258261
		Mouse	<i>Mus musculus</i>	1	NP733780
		Bird	<i>Gallus gallus</i>	1	XP419506
		Zebra fish	<i>Danio rerio</i>	1	XR_029838.2
	Insects	Fruit Fly	<i>Drosophila melanogaster</i>	1	AAF52639
		Bee	<i>Apis mellifera</i>	1	XM_001121775.1
		Mosquito	<i>Anopheles gambiae</i>	1	XP317569
	Nematode	Roundworm	<i>Caenorhabditis elegans</i>	0 ^b	-
	Cnidarian	Jelly fish	<i>Nematostella vectensis</i>	1	XM_001638859.1
	Choanoflagellé	Codonosigida	<i>Monosiga brevicollis</i>	1	XM_001744097
Champignons				0	-
Plante	Algae	Red alga	<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	0 ^c	-
		Green algae	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	0	-
			<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	0 ^c	-
	Bryophyte	Moss	<i>Physcomitrella patens</i>	1	XM_001770089.1
	Monocot.	Rice	<i>Oryza sativa</i>	1	BAD72522.1
	Eudicot.	Mouse-ear cress	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1	NM_126770.6
		Periwinkle	<i>Catharanthus roseus</i>	1	CAO94660.1

Tableau 12: Représentation des ABCC du clade III parmi les organismes Eukaryotes sélectionnés.

^a Les numéros d'accès depuis NCBI. ^b d'après Sheps *et al.* 2004. ^c d'après Hanikenne *et al.* 2005.

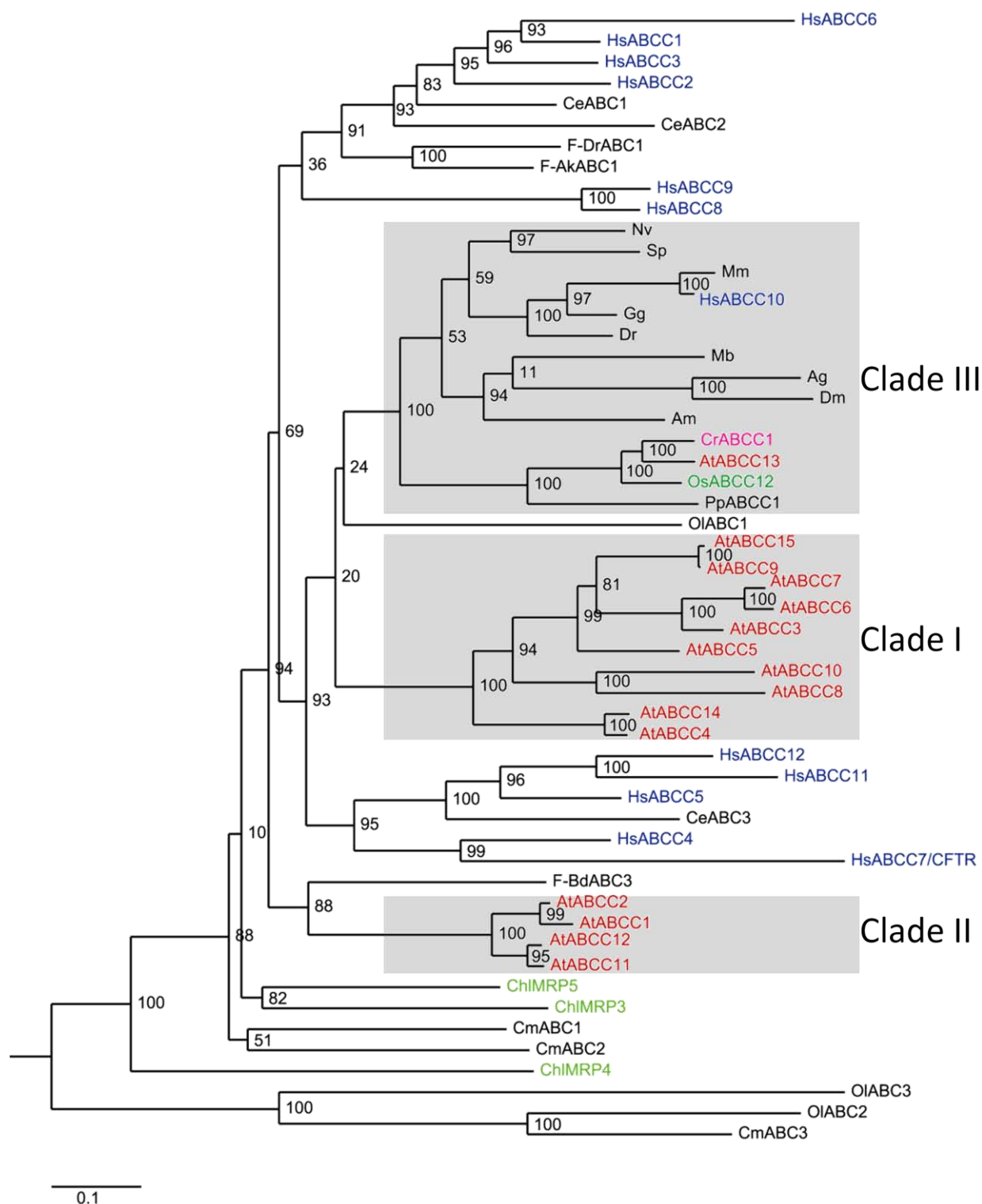


Figure 38: Analyse phylogénétique des séquences ABCC de plantes et d'animaux décrites dans le tableau 12.

L'analyse phylogénétique comprend les trois premières séquences blastées obtenues en utilisant CrABCC1 et HsABCC10 comme requête. F-AK, *Aspergillus Kawachii*; F-Dr, *Dacryopinax*; F-Bd, *Bartrachochytrium dendrobatidis*.

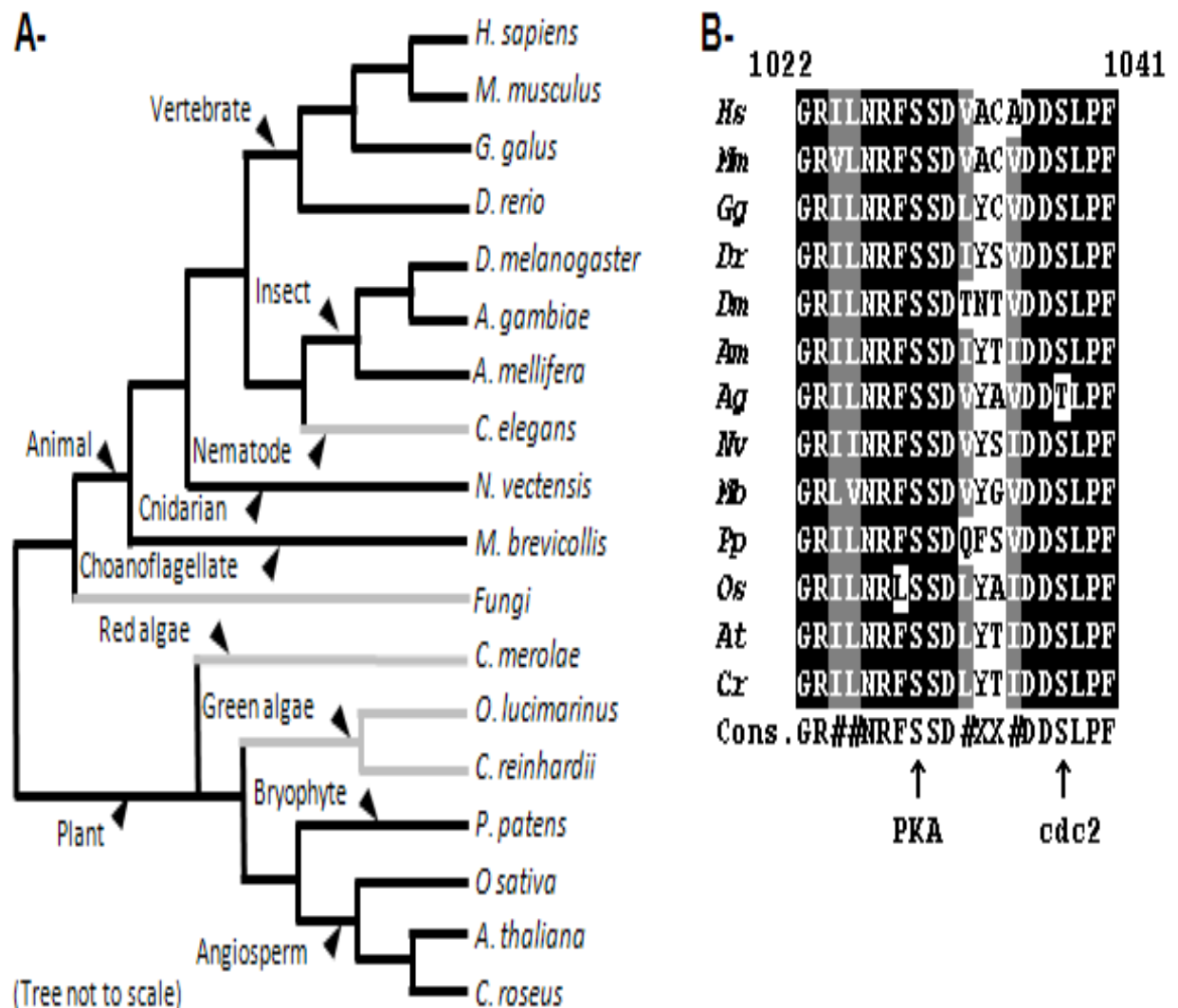


Figure 39: Spécificité des ABCC du clade III.

A- La distribution phylogénétique des MRP du clade III concernant la présence de l'intron U12. Les lignes en noir indiquent la présence d'un orthologue d'ABCC10. Les lignes en gris, absence d'un orthologue d'ABCC10. Les flèches présentent une brève description des branches. **B-** Alignement de séquences d'un peptide de 20 acides aminés appartenant aux ABCC du clade III. Les lettres au début de chaque ligne correspondent aux initiales des organismes cités dans le tableau 12. Les acides aminés sont numérotés par référence à la séquence de HsABCC10. Cons: indique séquence consensus. #: acide aminés aliphatiques. Protéine Kinase A pour PKA. Protéines de contrôle de la division cellulaire 2 (cdc2).

4. Conclusion

La recherche de transporteurs d'AIM chez *C. roseus*, notamment les anticancéreuses vinblastines et vincristine, a débuté par la recherche chez la plante des homologues aux gènes humains possédant des propriétés de transport de ces molécules. En effet, la sous-famille MRP/ABCC des transporteurs ABC est largement décrite chez l'homme comme vecteur de résistance aux chimiothérapies impliquant la vinblastine et la vincristine. ABCC1, 2, 3 et 10 sont capables dans plusieurs formes de tumeurs cancéreuses de transporter les AIM en dehors des cellules, conférant ainsi le phénotype de MultiDrug Resistance (Hopper-Borge *et al.* 2004). L'analyse phylogénétique comparée des ABCCs humains, d'*Arabidopsis* et du riz (*Oryza sativa*) a mis en évidence l'existence de trois clades ABCC chez les plantes : les clades I et II ne comprennent que des séquences de plantes et le clade III révèle un cas unique d'orthologie entre le gène humain ABCC10 et les gènes de plantes. L'investigation des ressources génomiques des plantes médicinales a permis d'identifier 16 loci d'ABCC de *C. roseus* ; deux d'entre eux correspondent aux orthologues d'ABCC10. Parce qu'ABCC10 est décrit comme transporteur d'AIM, son orthologue a été cloné chez *C. roseus* : *CrABCC1*. L'ADNc de *CrABCC1* est composé de 4839 paires de bases et code pour une protéine dont la taille est prédite à 163 KDa. ABCC10 et *CrABCC1* partagent la même topologie de 17 hélices- α transmembranaires. Un intron rare de type U12 a été identifié en deuxième position du gène *CrABCC1* et sa rétention produit une population d'ARNm additionnelle codant pour une protéine tronquée des 34 acides aminés de son extrémité amino-terminale. Plusieurs populations de transcrits ont été décrites pour ABCC10 et produisent également des protéines tronquées de la région N-terminale TMD0-CL0, supposée contenir les signaux d'adressage subcellulaire. Afin de tester un possible impact de ces modifications sur la localisation subcellulaire de la protéine *CrABCC1*, la préparation et la transfection de protoplastes chez *C. roseus* ont été mises au point. L'observation en microscopie à épifluorescence des protoplastes transfectés avec les constructions TMD0-CL0-YFP +/- TM1 révèle que la protéine de fusion sans troncation est détectée au tonoplaste alors qu'avec troncation, elle apparaît sous forme de vésicules autour du noyau. Les tentatives de localisation subcellulaire de la protéine *CrABCC1* complète restent quant-à elle encore à approfondir mais tout semble indiquer que ce transporteur est adressé au tonoplaste.

Cette particularité de transcrits alternatifs qui codent pour des protéines tronquée, identifiée chez les ABCC10 de mammifères, est également conservée chez les plantes supérieures et est dépendante de la présence d'un intron de type U12 au niveau de la séquence

codant la région TMD0-CL0. Nous avons montré que ce processus pourrait modifier la localisation au tonoplaste de TMD0-CL0 de *C. roseus*. Enfin, l'exploitation des valeurs FPKM de *CrABCC1* indique que le méthyl jasmonate, une phytohormone qui maintient l'équilibre entre les programmes de croissance et de défense (revue par Gfeller *et al* 2010), réprime l'expression de *CrABCC1*. D'autres investigations sont nécessaires afin de déterminer si les orthologues d'ABCC10 partagent des fonctions physiologiques similaires et des substrats communs chez les plantes et les animaux.



***Etude du transporteur AtABCC13
d'*Arabidopsis thaliana****



II. Etude du transporteur AtABCC13 d'*Arabidopsis thaliana*

1. Généralité sur la plante modèle : *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana est considérée comme une plante modèle en sciences du végétal grâce aux avantages multiples qu'elle offre pour les recherches en génétique et en biologie moléculaire (Page et Grossniklaus, 2002). En effet son petit génome de 125 méga-bases entièrement séquencé (The *Arabidopsis* Initiative, 2000) et l'existence de nombreux mutants disponibles, ont facilité les manipulations. Elle est caractérisée par un cycle de vie rapide, une petite taille adulte et par la production d'un grand nombre de graines. Sa transformation génétique à l'aide d'*Agrobacterium tumefaciens* peut désormais être effectué en routine dans les laboratoires qui ont peu ou pas d'expérience dans la culture des tissus végétaux et dans la transformation, ce qui permet l'analyse de multiples constructions d'ADN *in planta* (Azpiroz-Leehan et Feldmann, 1997 ; Clough et Bent, 1998).

Arabidopsis thaliana est une dicotylédone, Angiosperme de la famille des Brassicaceae (crucifères). Les différents organes qui la constituent ne sont pas formés lors de l'embryogenèse, mais tout au long de la vie de la plante. En effet, les nouveaux organes sont créés au niveau des méristèmes primaires qui contiennent les cellules souches. Le méristème apical caulinaire est responsable de la formation itérative de tous les organes aériens (feuilles, tige et fleurs) alors que le méristème apical racinaire est à l'origine du système racinaire. Chez les angiospermes, les premiers précurseurs de tissus vasculaires sont spécifiés lors de l'embryogenèse précoce (Rybel *et al.* 2013). Ces précurseurs donneront lieu au cylindre multicouches de l'hypocotyle et à la racine à travers des divisions contrôlées et orientées. Simultanément à sa croissance, le faisceau est modelé en xylème et phloème. Ces formations sont ensuite maintenues pendant la croissance post-embryonnaire et les cellules vasculaires finiront par se différencier, en montrant des modifications caractéristiques de la paroi secondaire (Rybel *et al.* 2013). Généralement, le système vasculaire de la plante, composé de xylème et de phloème, évolue pour connecter les organes végétaux et transporter différentes molécules. Au cours de la croissance post-embryonnaire, ces tissus conducteurs sont formés de manière constitutive à partir des cellules dérivées du méristème latéral, communément appelés procambium et cambium. Le procambium/cambium contient des cellules souches pluripotentes et fournit un microenvironnement qui maintient la population de cellules souches. Et étant donné que les plantes vasculaires continuent à former de nouveaux tissus et

organes tout au long de leur cycle de vie, la formation et le maintien des cellules souches sont cruciales pour la croissance et le développement de ces plantes (Miyashima *et al.* 2013).

Chez *Arabidopsis*, la rosette de feuilles est formé de 2 à 5 cm de diamètre située au ras du sol dont se détache une courte racine et un pédoncule floral portant une inflorescence (figure 40 A, B). D'autres inflorescences se forment sur les rameaux secondaires. Les fleurs blanches de quelques millimètres sont typiques des crucifères avec quatre sépales et quatre pétales disposés en croix, six étamines et un pistil (figure 40 C). C'est une plante très prolifique, son cycle peut s'accomplir entièrement *in vitro* en six à huit semaines. Chaque plant peut ainsi produire plusieurs milliers de graines à chaque génération. Après autofécondation, chaque fleur se transforme en un fruit qui est une capsule allongée, une silique, contenant de 30 à 50 minuscules graines (figure 40 D). Grace à ces graines qui accumulant entre 30% et 40% de lipides (Baud *et al.* 2002 ; Mansfield et Briarty, 1992), la plante présente un métabolisme très comparable à celui du colza et le développement et la maturation de la graine sont bien documentés (Baud *et al.* 2002 ; Laux *et al.* 2004 ; Lehti-Shiu *et al.* 2005 ; Lepiniec *et al.* 2005, 2006). *Arabidopsis* est aussi un excellent modèle pour étudier les métabolismes d'accumulation de réserves dans les graines oléagineuses si la lumière, la température et les autres facteurs de croissance ne sont pas limitant.



Figure 40:Présentation photographique des différentes parties d'*Arabidopsis thaliana*.

A- Rosette de feuilles. **B-** Plante en fleur. **C-** Inflorescence d'*Arabidopsis thaliana*. **D-** Siliques mature.

2. Rappel sur les ABCC d'*Arabidopsis thaliana*

Les transporteurs ABC constituent une superfamille de protéines décrite dans les différents règnes. Certaines familles ont une distribution restreinte aux eucaryotes comme les ABC appartenant à la sous-classe C (ABCC). Chez l'homme, parce qu'ils expulsent activement les agents anticancéreux hors de la cellule, les ABCC/MRP ont été décrits comme étant les principaux déterminants de la résistance des tumeurs à la chimiothérapie et sont donc largement étudiés (Leslie *et al.* 2001). L'analyse phylogénétique des ABCC d'homme et d'*Arabidopsis* (figure 41) montre que les ABCC/MRP sont subdivisés en trois clade phylogénétiques chez *Arabidopsis* (Kolukisaoglu *et al.* 2002 ; Schulz et Kolukisaoglu, 2006), dont deux sont assez bien caractérisés. Le clade I contient quatre gènes dont AtMRP1 et AtMRP2 qui sont impliqués dans les processus de détoxification cellulaire. Ces transporteurs montrent une expression relativement ubiquitaire chez la plante et sont impliqués dans la résistance aux métaux/métalloïdes et transportent divers composés tels que les phytochélatines (Song *et al.* 2010), les conjugués au glutathion (Lu *et al.* 1997), l'acide folique (AtMRP1) ainsi que les catabolites chlorophylliens (AtMRP2) (Lu *et al.* 1998). Les deux autres membres du clade I (AtMRP11 et AtMRP12) ont été peu étudiés. Cependant, ils partagent certaines propriétés de transport avec les ABCC/MRP du clade I à l'exception du transport des catabolites chlorophylliens qui semble être spécifique à AtMRP2 au sein de ce clade (Frelet-Barrand *et al.* 2008). Dix des quinze ABCC/MRP d'*Arabidopsis* appartiennent au clade II. L'expression d'AtMRP3 est induite dans les feuilles et les racines sous l'effet du cadmium (Cd^{2+}) ou plusieurs autres traitements métalliques (Bovet *et al.* 2003), elle confère aussi une tolérance au cadmium chez la levure (Tommasini *et al.* 1998). AtMRP3 est aussi impliqué dans le transport des conjugués au glutathion et, comme décrit pour AtMRP1 et AtMRP2, l'activité de transport des catabolites chlorophylliens a également été rapportée (Tommasini *et al.* 1998). AtMRP6 et AtMRP7 sont les homologues les plus proches d'AtMRP3 et sont également régulés par le Cd^{2+} . Chez les mutants AtMRP6, les feuilles présentent une plus grande sensibilité au Cd^{2+} (jaunissement) comparées aux plantes sauvages. Cependant, le profil d'expression d'AtMRP6 suggère qu'il n'est pas seulement impliqué dans la tolérance au Cd^{2+} , mais aussi dans certains processus développementaux. En effet, en condition standard de culture, AtMRP6 est aussi exprimé tôt au cours du développement des germinations, dans le méristème apical et au niveau du point d'initiation des racines secondaires (Gaillard *et al.* 2008). AtMRP7 est quant-à lui exprimé de façon constitutive dans les racines et les feuilles et la protéine est localisée à la fois dans le

plasmalemmes et le tonoplaste (Wojas *et al.* 2009). La surexpression d'AtMRP7 dans le tabac augmente légèrement la résistance des plantes au Cd^{2+} mais modifie plus profondément le contrôle de la translocation du cadmium depuis les racines vers les parties aériennes.

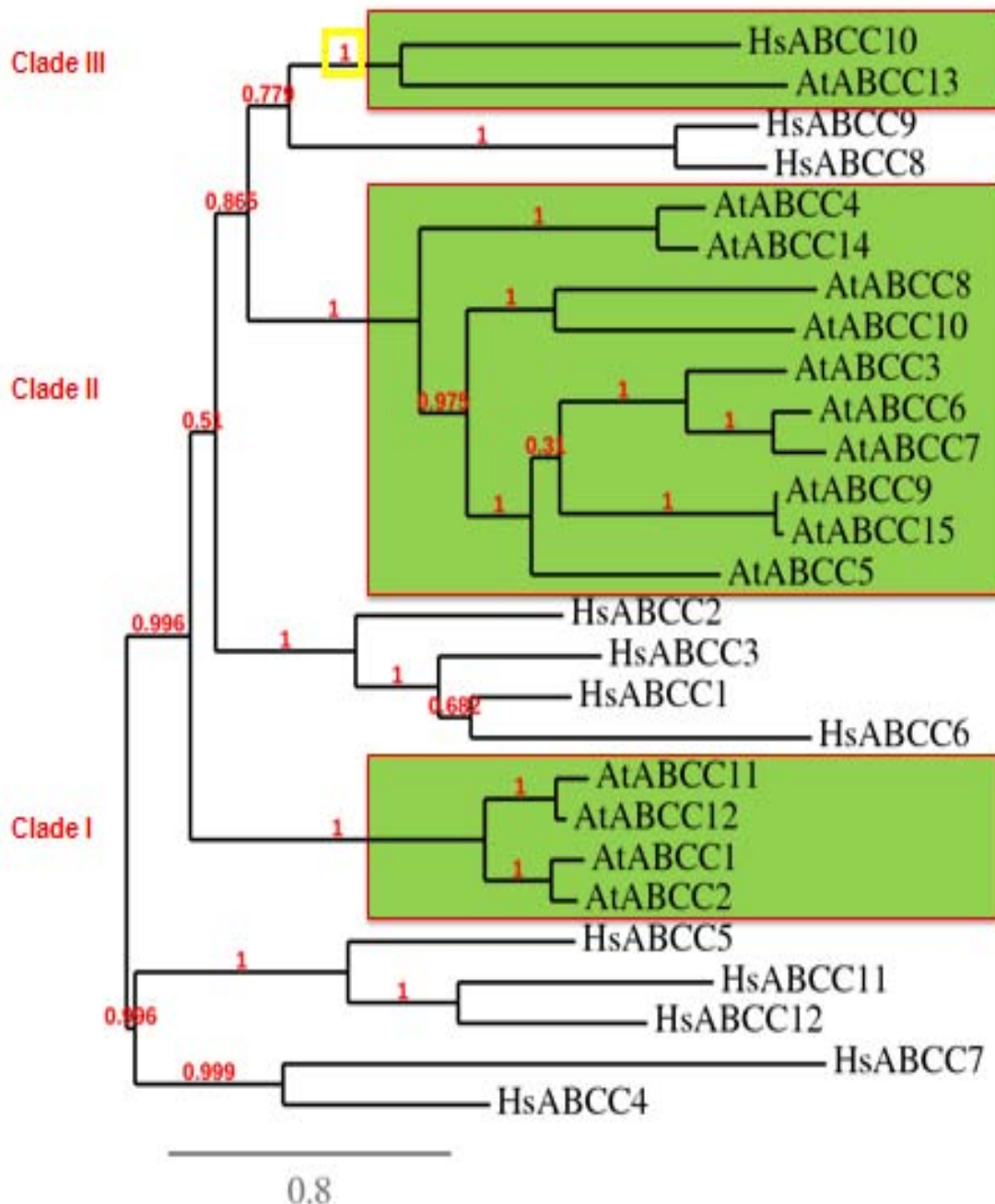


Figure 41: Analyse phylogénétique des ABCC d'homme et d'Arabidopsis.

I, II, III désignent les trois clades phylogénétiques d'ABCC chez *Arabidopsis thaliana* (représenté en vert). Dans le clade III, l'orthologie Arabidopsis/homme est appuyée par une valeur de bootstrap de 1 (cadre jaune). Hs, *Homo sapiens*; At, *Arabidopsis thaliana*.

Ces observations suggèrent qu'AtMRP3 et ses homologues les plus proches, peuvent se comporter comme des détoxifiants métalliques bien que d'autres fonctions dans la plante ne puissent pas être exclues.

AtMRP4 et AtMRP5 appartiennent également au clade II et, bien qu'ils partagent de faibles homologies de séquences, leurs profils d'expression associés aux stomates suggèrent un rôle conjoint dans l'adaptation des plantes au stress hydrique plutôt que dans la détoxification cellulaire. En effet, les mutants d'AtMRP4 montrent une augmentation dans la perte d'eau en raison d'une ouverture plus grande des stomates. Le substrat endogène physiologique d'AtMRP4 n'a pas été identifié à ce jour. Cependant, parce qu'il est fortement exprimé dans les cellules de garde et localisé à la membrane plasmique, AtMRP4 a été supposé être impliqué dans la régulation stomatique des canaux ioniques (Klein *et al.* 2004). AtMRP5 est également exprimé dans les cellules de garde mais localisé dans le tonoplaste (Nagy *et al.* 2009). Fait intéressant, Nagy *et al.* (2009) ont démontré qu'AtMRP5 est un transporteur de haute affinité à l'hexakisphosphate inositol (IP6), une molécule qui module la signalisation calcique et l'homéostasie du potassium dans les cellules de garde. Les mutants d'AtMRP5 montrent une capacité réduite dans l'exportation de l'IP6 dans la vacuole, ce qui entraîne une fermeture constitutive des stomates et une perte d'eau réduite chez les plantes (Klein *et al.* 2003 ; Suh *et al.* 2007).

Le clade III n'a pas été caractérisé fonctionnellement à ce jour. L'étude du génome d'*Arabidopsis* (AGI 2000) a révélé un seul MRP/ABCC appartenant au clade III, *AtABCC13/MRP11* (At2g07680). Dans cette étude, nous avons étudié en détail le profil d'expression d'*AtABCC13* chez *Arabidopsis thaliana*. L'utilisation du gène rapporteur GUS révèle que l'expression d'*AtABCC13* est liée au système vasculaire, à la maturation des graines et au développement des germinations. En outre, des analyses quantitatives de l'expression du gène ont identifié des régulations hormonales et nutritionnelles. Plusieurs éléments *cis* régulateurs identifiés suite à l'analyse *in silico* de la séquence du promoteur d'*AtABCC13* ont appuyé ces observations. Nos résultats montrent que le profil d'expression d'*AtABCC13* présente des caractéristiques originales parmi les transporteurs ABCC chez *Arabidopsis*.

3. Résultats et discussions

3.1. Caractérisation d'*AtABCC13*

Chez *A. thaliana*, *AtABCC13* est l'orthologue de *CrABCC1* et de *HsABCC10*. Les données obtenues sur la séquence génomique de *CrABCC1* ont permis par comparaison de déterminer l'organisation génomique de la région 5' d'*AtABCC13*, de retrouver un intron de type U12 en deuxième position et d'identifier le premier ATG par RT-PCR (figure 42). La caractérisation d'*AtABCC13* se déroule en trois étapes :

- Déterminer l'organisation génomique de la région 5' du gène *AtABCC13*
- La caractérisation du promoteur de transcription d'*AtABCC13*
- L'identification et l'étude de lignées *knock-out* homozygotes pour *AtABCC13*

3.1.1. Organisation génomique de la région 5' d'*AtABCC13*.

Les orthologues de *CrABCC1* chez *Arabidopsis* (*AtABCC13*) et chez le riz (*OsABCC12*) ont été décrits précédemment sans l'extension N-terminale TMD0-CL0 (Shultz FEBS, 2006). Grâce à la détermination expérimentale de l'organisation génomique de *CrABCC1*, nous avons proposé une nouvelle annotation des gènes pour la partie 5'. Cette nouvelle annotation comprend une région codant pour l'extension TMD0-CL0, ignorée à ce jour ainsi qu'un intron de type U12 en 2^{ème} position. Cependant, le faible taux de conservation entre les séquences amino-terminales de *CrABCC1* et *AtABCC13* n'a pas permis d'identifier sans ambiguïté la position du premier ATG d'initiation de traduction d'*AtABCC13*. La position du premier exon d'*AtABCC13* qui comprend le codon d'initiation ATG a nécessité une confirmation expérimentale complémentaire. A partir, de la séquence génomique d'*Arabidopsis* et de l'organisation de *CrABCC1*, trois positions potentielle ont été identifiées pour ce premier exon. Des amorces PCR orientées en sens ont été désignées sur ces trois exons potentiels et inclues la position du premier codon STOP en phase avec l'ATG d'initiation présumé (amorces désignées ATG1, ATG2 et ATG3) (figure 42, en jaune). Une quatrième amorce orientée en inverse est désignée dans l'exon 3 et sera couplée aux amorces sens pour les différentes amplifications. L'efficacité des amorces est évaluée par PCR sur de l'ADN génomique (figure 43 A). Le profil observé correspond aux tailles des produits d'amplification PCR attendues. Les PCR conduites avec les mêmes amorces sur ADNc ne produisent pas d'amplification avec les amorces des ATG1 et ATG2 et produisent deux bandes

de 113 et 211 pb avec l'amorce ATG3 (figure 43 B). Ce résultat montre que les séquences contenant les amorces ATG1 et ATG2 ne sont pas transcrites ici et par conséquent ne peuvent pas constituer l'exon 1 d'*AtABCC13*. Après séquençage des produits PCR obtenus avec l'amorce ATG3, nous avons pu déterminer que la bande à 113 pb correspond à l'assemblage des exons 1-2-3 avec épissage des introns 1 et 2, et la bande de 211 pb correspond au même fragment mais avec rétention de l'intron 2. Par conséquent, on peut conclure que l'ATG3 code pour la première méthionine d'*AtABCC13* et qu'une population de transcrits *AtABCC13* ne subit pas un épissage complet de l'intron 2, de type U12.

Les plantes supérieures (ici, *Catharanthus*, *Arabidopsis* et le riz) partageant donc la même organisation génomique pour la région TMD0-CL0 de ce gène, ce qui inclut la conservation d'un intron de type U12 en position 2, et il semble aussi que l'intron 2 ne soit que partiellement épissé dans la population de transcrits (*CrABCC1* et *AtABCC13*). L'existence de transcrits différentiels et l'impact sur les fonctionnalités des protéines restent énigmatiques. Cependant, la conservation de ces processus dans différents règnes du vivant (Cf *HsABCC10*) suggère un rôle important de ces transcrits différentiels, peut-être dans la localisation subcellulaire de la protéine, l'activité enzymatique ou dans des mécanismes de régulation post-transcriptionnels.

ggacagacacttgggtagaaaacccaagag **ATG** AGT GGC TTC CAC GTC ATC CTT TAC AGT GAT CCT CGC ACG CAT gtataacacttatatcagtc 15
 431
 M D H F Q L N F N F N D A S F
 aaagtcattatTTTaaac **ATG** GAC CAT TTC CAA CTT AAC TTT AAC TTT AAT GAT GGC AGC TTT gtgtcacaccacttactaataaacgtagaat 30
 527
 atatccaaaatgaactaaaacactaacgtggaatattaaatatagaaaaacaaagaattggaacagttcatcggaagggttttgggaccctagagaatcc**ATG** GCT 32
 636
 I T L T N F T gtaagtacactattttactttctctatggtttgttgatgatgaaaaatttatcaatctttgtctcagTTT CTC TAT 42
 736
 M D A N L K R L G D
 ATG GAT GCA AAC CTG AAA CGT TTA GGC GAC AT atatccttccttgaacttcatgggtttataggagtttgogtatgtatatagatacatgaatgetcaatt 52
 837
 I V L G F G A N V V T L L L I L I L T I T 73
 ttggattgttcttctaagaatgattaca GTT TTA GGG TTT **GCA AAT GTA GTT ACT CTT** CTT CTG ATT CTG ATT CTC ACC ATA ACG 927
 R R N G R C N R R
 AGA AGA AAT GGT AGA TGT AAC AGA AGG gtaagagtaagcctaattttctacttttggttttgtaaaaaaaagaactgattcgtctcatttgattttcttt 82
 1029
 K S Y I E K C L L Y V T P A L G A C L S C V D L V L L 109
 attagAAA AGC TAC ATT GAG AAG TGT TTG TTG TAT GTA ACA CCT GCA CTT GGA GCT TGT TTG TCA TGT GTG GAC TTG GTG TTA CTT 1115
 V R T N R R R E V I L C F V P L S G F V M W 131
 GTG AGA ACA AAC CGT AGG AGA GAA GTC ATT CTC TGT TTT GTC CCC TTG TCT GGT TTC GTA ATG TGG gtaagcttcttgttaccacacac 1204
 I A V I L S L K F A C C 143
 gaacagaactctgttcttctctctcttttcttctgttctgaagggtttttttacottgttagATT GCC GTC ATC CTC TCA TTG AAG TTT GCT TGT TGT 1304
 A C H V F T S Q I L C F W W I F R F L T D A L H L N M I 171
 GCG TGC CAC GTT TTC ACT AGC CAG AIT CTA TGT TTC TGG TGG ATC TTT AGA TTC CTA ACA GAT GCC CTT CAT CTT AAC ATG AIT 1388
 F T L Q 181
 TTC ACA TTA CAG gtaattaagttgtctttatgaatctgtcactctccatataagtagagtttggttaaccgaatttgagCGT GTA CAG GAG AIT TGC 1487

Figure 42: Validation de la première méthionine d'AtABCC13 par RT-PCR.

Les flèches en jaunes désignent les amorces sens désignées sur les « exon 1 » potentiels et en bleu l'amorce anti-sens utilisée en PCR pour la figure 50. L'intron 2 de type U12 est souligné.

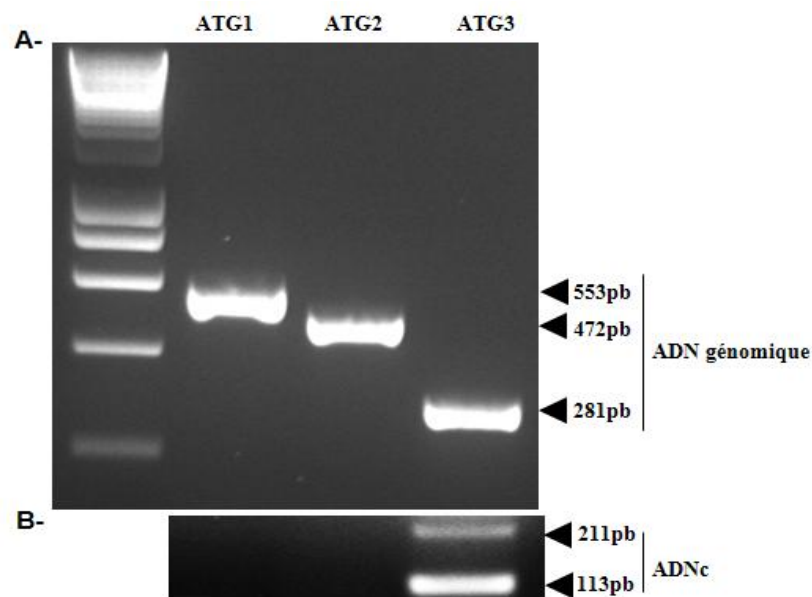


Figure 43: Validation de la première méthionine d'AtABCC13.

A- PCR sur ADN génomique, les trois bandes amplifiées correspondent aux 3 ATG potentiels. **B-** PCR sur ADNc. Les produits PCR de 113 et 211 bp ont été séquencés et analysés.

3.1.2. Caractérisation du promoteur de transcription d'*AtABCC13*.

La caractérisation du promoteur de transcription d'*AtABCC13* est dans un premier temps abordée pour identifier les tissus de la plante où le gène est exprimé. Dans un deuxième temps, on s'intéressera à cerner les facteurs influençant les niveaux d'expression du gène.

3.1.2.1. Profil d'expression d'*AtABCC13* au niveau de la plante.

Le promoteur *AtABCC13* a été obtenu par PCR sur l'ADN génomique en utilisant les amorces suivantes :

promF, 5'-ATACCCCGCTCGAGGGTTTATAAGGTACAGGTTAGGG-3' et
promR, 5'-ATACCCCGCTCGAGAGTGATAGCCATGGATTCTCTAGGGTC-3'. Le produit PCR de 2092 pb obtenu, correspond aux 2075 pb paires de bases situées sur le génome d'*Arabidopsis* immédiatement en amont du codon de la première méthionine d'*ABCC13* et aux 17 premiers nucléotides codant pour *AtABCC13*. Après la digestion par *XhoI*, le fragment a été inséré dans le site de restriction adéquat au niveau du vecteur binaire pBi102 (St-Pierre et Brisson, 1995), ensuite fusionné au gène rapporteur GUS (β -glucuronidase) (figure 44) pour un suivi histochimique de l'activité du promoteur. La construction pBi-*promAtABCC13-Gus* obtenue a été séquencée et introduite dans la souche *Agrobacterium tumefaciens*. Les plantes sauvages d'*Arabidopsis* ont alors été génétiquement transformées par la méthode du *floral dipping* (voir méthodes 3.3). L'analyse de la plante entière à différents stades de développement a permis d'établir une carte d'expression complète du promoteur du gène *AtABCC13*.

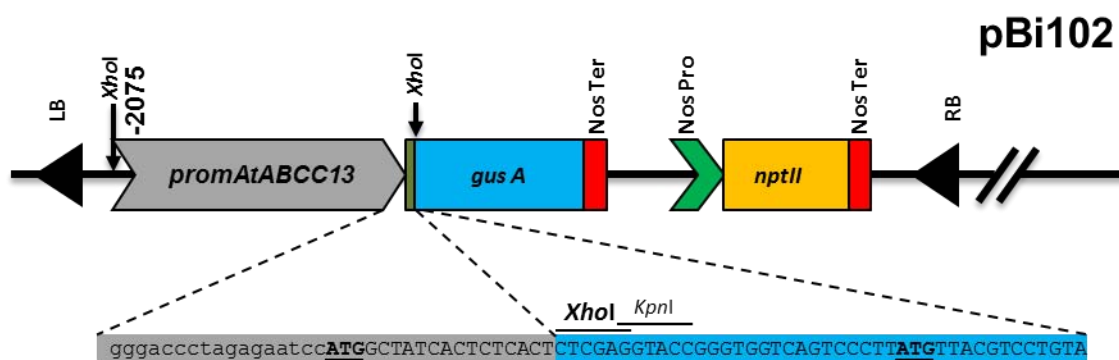


Figure 44:Représentation schématique de la construction moléculaire de la fusion entre du promoteur de transcription d'AtMRP13 et le gène rapporteur.

LB et RB: bordures gauche et droite de l'ADNT. *Nos Pro*: promoteur de la nopaline synthase; *Nos Ter*: terminateur de la nopaline synthase; *nptII*: neomycin phosphotransferase. Séquence nucléotidique de la fusion traductionnelle est signalée. Le codon d'initiation de la transcription d'*AtABCC13* et le premier codon GUS, en phase, sont soulignés.

a- *AtABCC13* est exprimé dans les organes végétatifs et au cours de la différenciation des racines latérales.

Le profil d'expression du promoteur d'*AtABCC13* fusionné au gène rapporteur GUS a été examiné à différents stades de développement et dans différents organes de la plante. Dans les organes végétatifs, *AtABCC13* est exprimé dans les tissus vasculaires des cotylédons et des premières feuilles alors qu'aucune coloration GUS n'est observée dans le méristème apical de la tige (figure 45 A). Dans les feuilles matures, une forte coloration GUS est observée dans les veines primaires, secondaires et tertiaires (figure 45 B) alors que les trichomes et les stomates ne sont pas marqués (figure 45 C, D). La forte expression des ABCCs du clade II (*AtMRP4* et *AtMRP5*) au niveau des cellules garde (Klein *et al.* 2004, Nagy *et al.* 2009) n'est donc pas conservée chez *AtABCC13* appartenant au clade III. Nous avons remarqué également qu'aucune activité GUS n'est détectée dans la section transversale d'une jeune tige (figure 45 E) alors qu'un signal, qui correspond à la zone du cambium, est observé entre le xylème primaire et le phloème de la tige mature (figure 45 F). Le détail de la zone des faisceaux vasculaires révèle qu'au niveau des jeunes tiges, l'expression d'*AtABCC13* est absente dans l'interface entre le xylème primaire et le phloème (figure 45 G), mais elle est associée à la zone du cambium fasciculaire au niveau des tiges mature (figure 45 H). En effet, chez

Arabidopsis, le cambium fasciculaire est actif et produit des tissus vasculaires secondaires avant l'achèvement du cambium interfasciculaire (Sehr *et al.* 2010). Nous avons remarqué que l'expression d'*AtABCC13* est restreinte au cambium fasciculaire actif (figure 45 H, les couches du xylème secondaire sont visibles) et non pas au cambium interfasciculaire en cours de développement. Ces résultats suggèrent que l'expression d'*AtABCC13* est plutôt associée à la différenciation des tissus vasculaires secondaires qu'à l'établissement du cambium. *AtABCC13* est également exprimé dans la zone de transition de l'apex racinaire, la coloration apparaît sous forme de deux fuseaux confinés au péricycle (figures 45 I). La zone de transition est située entre le méristème apical et de la zone d'élongation, et détermine le devenir des cellules et la croissance racinaire. Le péricycle est composé de deux types cellulaires différents, le premier groupe de cellules étant associé à la formation de xylème et montrant une forte compétence dans l'initiation des divisions cellulaires alors que le deuxième groupe de cellules, associé au phloème, semble demeurer quiescent (Parizot *et al.* 2008). La coloration GUS en forme de fuseaux symétriques observée au niveau de l'apex racinaire (figure 46) est caractéristique des cellules de péricycle associées aux pôles du xylème (De Smet *et al.* 2007 ; Laplace *et al.* 2007 ; Parizot *et al.* 2008 ; Nieuwland *et al.* 2009). Les cellules du péricycle, adjacentes aux pôles du protoxylème (Benkova et Bielach, 2010) sont des cellules définies comme étant des fondatrices situées au niveau de la zone de transition avant la différenciation tissulaire ; ces cellules acquièrent un destin développemental différent des autres cellules du péricycle et, par conséquent, jouent un rôle primordial dans l'initiation de la racine latérale (Parizot *et al.* 2008). Cependant, aucune activité GUS n'a été observée lors de l'activation du cycle cellulaire dans les cellules fondatrices du péricycle qui initient la formation de racines secondaires (figure 47 A). Les figures (47 B, C) montrent la croissance secondaire du méristème latéral et la perforation du parenchyme avant l'émergence de la racine (figure 47 D). L'émergence n'est pas associée avec des divisions cellulaires mais à un allongement des cellules qui permet un accroissement de la taille du primordium. Les cellules des tissus externes s'écartent pour laisser passer le primordium en croissance. Après émergence, les divisions cellulaires reprennent à l'apex de la racine latérale nouvellement formée (Malamy et Benfey, 1997). L'observation détaillée (figure 48), montre que le promoteur d'*AtABCC13* est activé pendant la différenciation du système vasculaire au niveau de la zone de formation du péricycle de la racine secondaire (figures 47 E). Et comme observé dans la racine primaire (figures 45 I et 46), l'expression

d'*AtABCC13* diminue dans la zone de maturation et reste maintenue à proximité de l'apex racinaire (figures 47 *F, G*).

Ces premiers résultats portant sur l'analyse des parties végétatives indiquent qu'*ABCC13* est exprimé dans la plupart des organes de la plante à travers un profil strict et spécifique associé aux tissus vasculaires. *AtABCC13* semble être associé à des zones actives du cambium vasculaire et au processus de différenciation des faisceaux vasculaires.

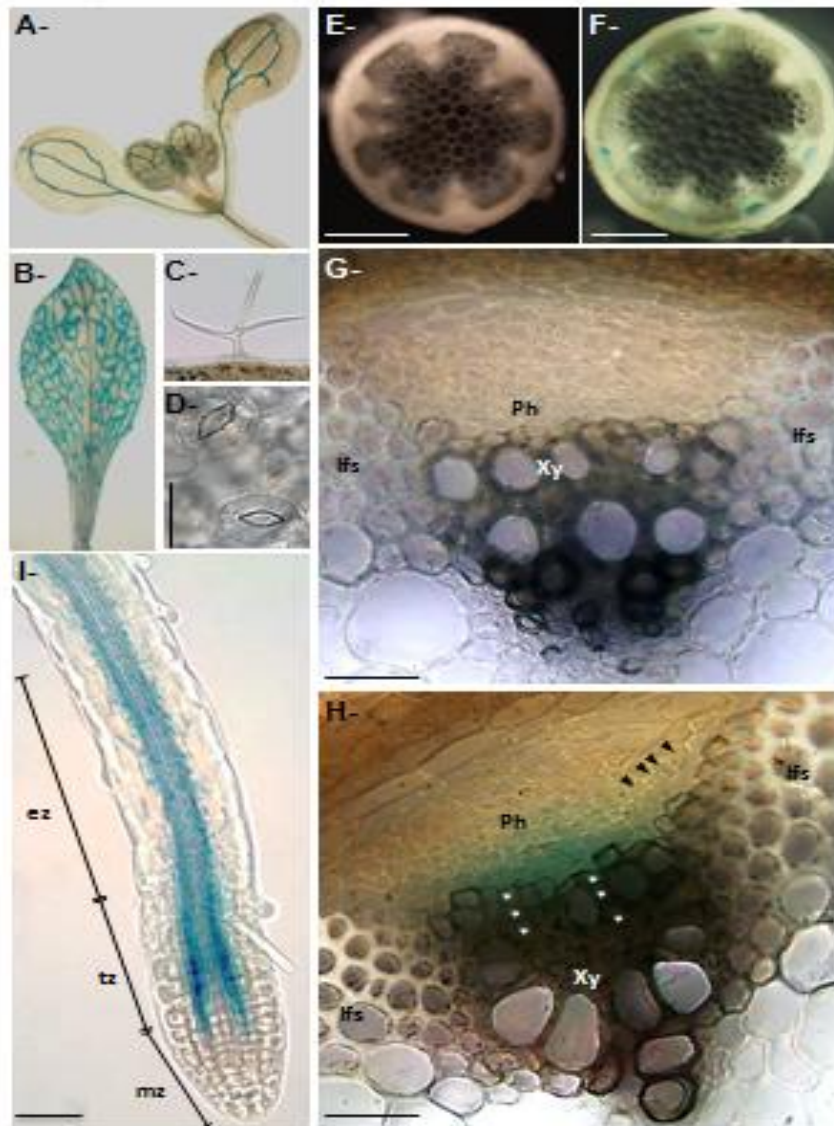


Figure 45: AtABCC13 d'*Arabidopsis thaliana* est exprimé dans les tissus vasculaires des organes végétatifs transformés avec la construction promAtABCC13-Gus.

A- La coloration GUS au niveau des premières feuilles et des cotylédons des germinations âgées de 10 jours; **B-** Feuille mature de plante adulte; **C-** Stomates; **D-** Trichome; **E-** Coupe transversale d'une jeune tige; **F-** Coupe transversale d'une tige mature(avec tissus secondaires); **G-** Détail des faisceaux vasculaires de E, **H-** Détail des faisceaux vasculaires de F, **I-** coloration de l'apex racinaire suite à une incubation de 30 min dans le tampon de réaction GUS. Les étoiles blanches indiquent les cellules du xylème secondaire. Les flèches noires indiquent les divisions des cellules périclinales du cambium interfasciculaire en développement. Ph, phloème primaire; Xy, xylème primaire; Ifs, fibres interfasciculaires de la tige (selon Serh *et al.* 2010.); mz, zone méristématique; tz, zone de transition de la racine; ez, zone d'élongation racinaire (selon Baluska *et al.* 2010). Barre d'échelle: E, F et I, 200 µm; C, G et H, 20 µm.



Figure 46:Détail de l'expression d'*AtABCC13* au niveau de la pointe de la racine primaire d'*Arabidopsis thaliana*.

Organisation cellulaire selon Overvoorde *et al.* 2010. 1- coiffe; 2- épiderme; 3- cortex; 4- endoderme; 5- péricycle; 6- stèle.

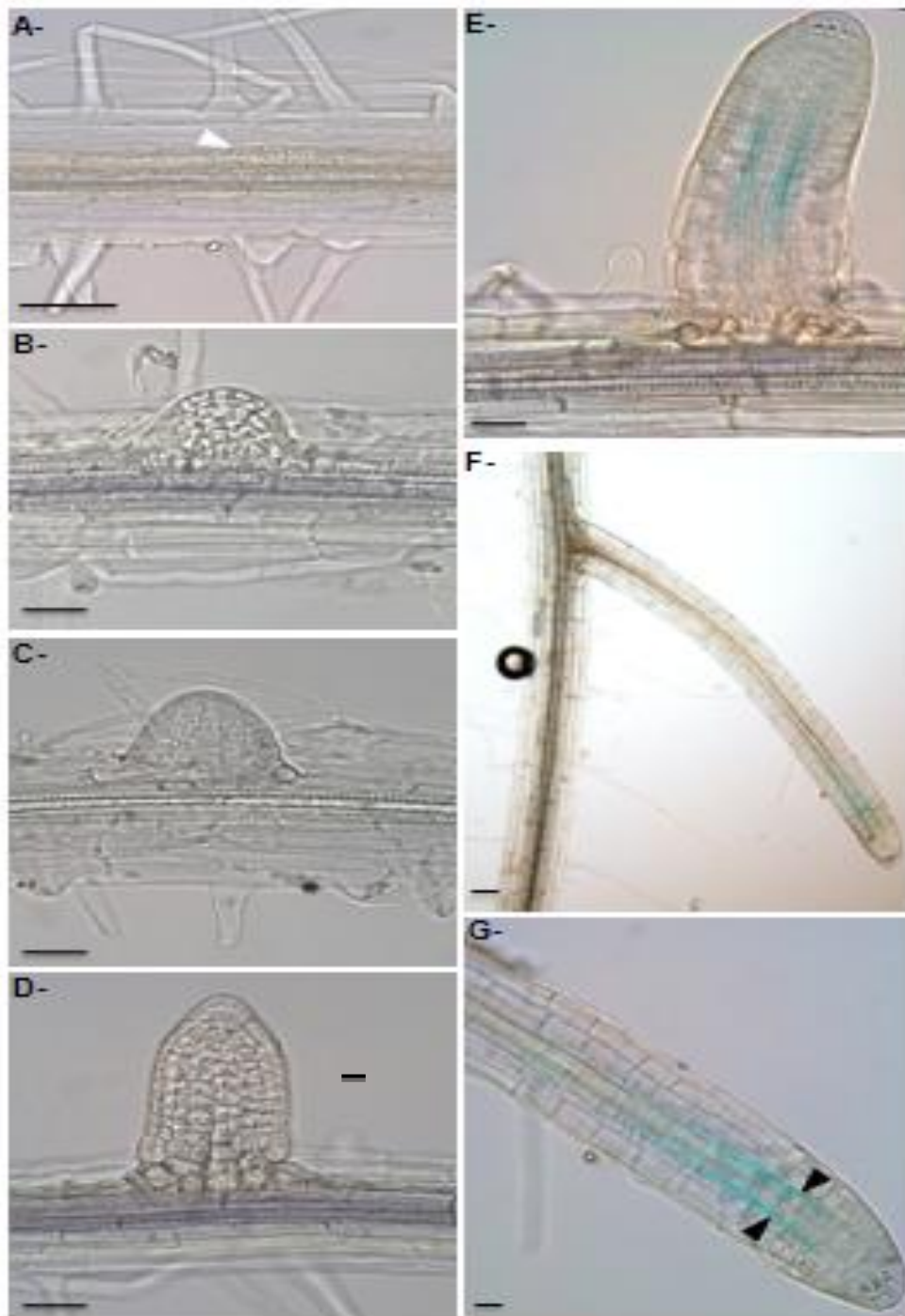


Figure 47: AtABCC13 est exprimée pendant la différenciation des racines latérales des plantules âgées de 3 jours.

A- ébauche d'un primordium de racines latérales (tête de flèche), **B, C-** Début de développement de la racine latérale; **D-** Emergence de racines latérales, les tissus encore peu différenciés; **E-** coloration GUS au niveau des vaisseaux conducteurs du procambium; **F-** l'expression AtABCC13 est limitée à la zone de transition / élongation. **G-** détail de F. Barres d'échelle: 200 µm. Les échantillons D et E, ont été incubés 30 min dans du tampon de réaction GUS au lieu de 16 heures.



Figure 48: Détail de l'expression d'AtABCC13 au niveau d'une racine latérale d'*Arabidopsis thaliana*.

Organisation cellulaire selon De Smet *et al.* 2006. 1- épiderme; 2- cortex; 3- endoderme; 4- péricycle; 5- stèle.

❖ **Traitements hormonaux et modification de l'activité du promoteur d'*AtABCC13***

La mise en place des tissus vasculaires chez la plante est en forte dépendance des contrôles hormonaux complexes (Elo *et al.* 2009), et dans le but de tester une éventuelle régulation hormonale du promoteur d'*AtABCC13*, l'activité GUS a été mesurée par spectrofluorimétrie sur des germinations placées sur des milieux de culture complétés par autre familles majeures de phytohormones : l'acide indole 3-acétique (AIA, une auxine), l'acide gibbérellique (AG), l'acide abscissique (ABA), la zéatine (une cytokinine) ou l'acide 1-naphtalène acétique (ANA).

L'activité du cambium et la différenciation en xylème et phloème est principalement guidée par les interactions entre auxine, gibbérelline et cytokinine (Elo *et al.* 2009). Ces hormones sont distribuées différemment à travers la zone cambiale. L'auxine est considérée comme l'un des régulateurs clé de l'activité cambiale. En effet, dans la tige, l'auxine montre un pic de concentration dans les cellules du cambium en division et diminue brusquement dans le xylème et le phloème en développement (Uggla *et al.* 1996; Tuominen *et al.* 1997; Elo *et al.* 2009), tandis que la gibbérelline et la cytokinine montrent des pics au niveau du xylème différencié et du phloème, respectivement (Israelsson *et al.* 2005, Bishopp *et al.* 2011).

Dans nos conditions expérimentales, l'AIA ne modifie pas significativement l'activité GUS (figure 49 A). Cet effet, peut être compatible avec l'idée que le promoteur d'*AtABCC13* est actif dans la zone cambiale en différenciation (indépendant de l'auxine) et non pas lors de l'établissement du cambium interfasciculaire (dépendant de l'auxine) (figure 45 H).

Le traitement à l'acide gibbérellique augmente l'activité du promoteur (figure 49 B) alors que la zéatine (figure 49 C) ainsi que l'acide 1-naphtalène acétique (ANA) la réduisent. Fait intéressant, dans nos expériences, nous avons remarqué qu'aucun traitement hormonal n'a altéré la localisation de l'expression du promoteur d'*AtABCC13* qui se cantonne au niveau des faisceaux vasculaires de la plante. L'induction de l'activité du promoteur d'*AtABCC13* par l'acide gibbérellique suggère que ce transporteur pourrait avoir un rôle dans le transport de ce métabolite ou bien dans les processus de développement régulés par l'AG. Enfin, l'ABA a été principalement impliqué dans la réponse au stress hydrique et la dormance des graines (Agarwal and Jha, 2010). Toutefois, cette hormone a été également associée à la cessation de l'activité cambiale (Baba *et al.* 2011). En effet, l'activité du promoteur d'*AtABCC13* a régressée lorsque les plants ont été cultivés sur un milieu supplémenté en ABA (figure 49 D).

L'effet négatif de l'ABA sur l'activité du promoteur *d'AtABCC13* pourrait être lié au rôle inhibiteur de cette hormone lors de la différenciation des tissus vasculaires, là où *AtABCC13* est exprimé. Il est à noter que les transporteurs de type ABCC ne sont pas impliqués dans le transport d'ABA alors que les transporteurs ABCG le sont. En effet, récemment, des études ont mis en évidence deux transporteurs d'ABA : *AtABCG25* (Kuromori *et al.* 2010) et *AtABCG40* (Kang *et al.* 2010). Le transporteur *AtABCG25* est principalement présent dans les tissus vasculaires alors qu'*AtABCG40* est majoritairement présent dans les cellules de garde des jeunes feuilles et dans les racines primaires et secondaires. D'après ces études, un premier modèle du transport de l'ABA a émergé : l'ABA est d'abord exporté depuis les cellules des tissus vasculaires vers l'apoplasme des cellules de garde par *AtABCG25*, puis importé par le transporteur *AtABCG40* de l'apoplasme vers le cytoplasme des cellules de garde afin de réguler l'ouverture des stomates. Malgré la modulation de l'activité du promoteur *AtABCC13* par l'ABA son profil d'expression dans la plante ne semble pas indiqué que ce transporteur soit impliqué directement dans la signalisation ABA mais plutôt en lien avec l'acide gibbérellique.

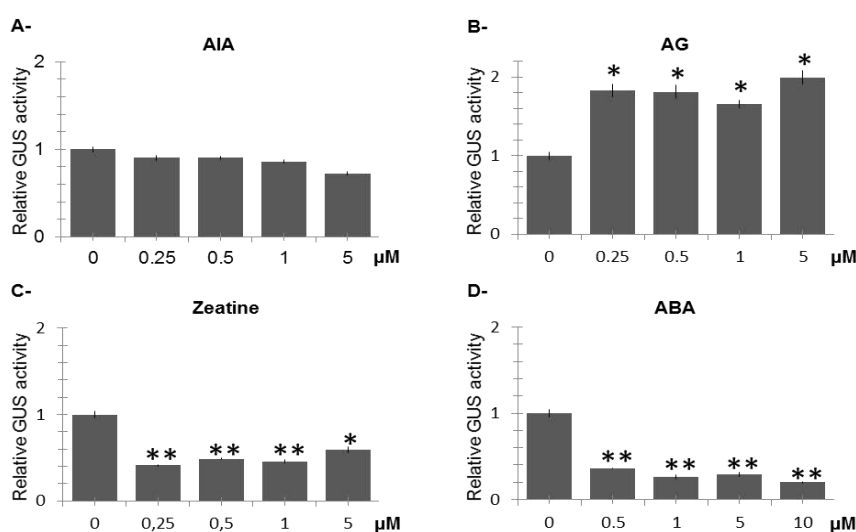


Figure 49: Régulation hormonale *d'AtABCC13*.

Les plants transgéniques d'*Arabidopsis* exprimant la construction du promABCC13::GUS ont été cultivés quatre jours sur milieu MS standard (0.5x) ensuite transférés quatre jours sur milieu MS (0.5x) complété par des concentrations croissantes de phytohormones avant d'effectuer les mesures fluorimétriques de l'activité GUS. **A-** l'acide indole-3-acétique (AIA), **B-** l'acide gibbérellique (GA); **C-** la zéatine; **D-** l'acide abscissique (ABA). L'activité GUS obtenue sans les hormones testées est utilisée comme référence (moyenne $\pm$ écart-type). Les astérisques indiquent que les différences sont significatives par rapport à la référence, selon les tests t de Student (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$).

Dans l'apex racinaire, l'auxine, la cytokinine et l'acide gibbérellique interagissent pour contrôler l'équilibre lors des divisions cellulaires dans la zone méristématique et pour acquérir une identité cellulaire dans la zone de différenciation/élongation (Moubayidin *et al.* 2010). Le basculement entre auxine et cytokinine qui se produit dans la zone de transition/élongation fait intervenir les gibbérellines. En effet, la croissance racinaire nécessite la voie de signalisation des gibbérellines afin de promouvoir l'élongation cellulaire suite à la dégradation des répresseurs transcriptionnels de la réponse aux gibbérellines (Ubeda-Tomás *et al.* 2008) ; ces répresseurs sont les protéines DELLA, dont les cibles ne sont pas encore totalement identifiées. En développant une gibbérelline marquée par fluorescence, Shani *et al.* (2013) ont démontré que les gibbérellines s'accumulent dans la zone de transition/élongation des cellules endodermique racinaire chez *Arabidopsis*. Le mécanisme par lequel l'AG endodermique pourrait induire la localisation d'*AtABCC13* au niveau des racines dans le péricycle n'est pas encore élucidé et pourrait impliquer d'autres facteurs qui contrôlent l'expression d'*AtABCC13* dans la racine.

b- AtABCC13 est exprimé dans les fleurs, les graines et les plantules en développement

L'expression d'*AtABCC13* est également associée aux tissus vasculaires des sépales et aux extrémités du pédoncule au stade bouton floral (figure 50 A). Dans la fleur mature vient s'ajouter une ponctuation sur l'anthere (figure 50 B) ; l'observation détaillée montre que le point bleu semble être un groupe de cellules entourant les éléments vasculaires au niveau de la jonction du filament sur l'anthere (figure 50 C). Au niveau des organes femelles, aucun signal n'est observé dans le gynécée avant la pollinisation (figure 50 D). La présence du pollen sur le stigmate est accompagnée d'une augmentation progressive du marquage des ovules du haut vers le bas de l'ovaire (figure 50 E). Les figures 50 F et G, montrent une coloration de la jonction entre funicules/chalaze dans les ovules (les ovules du haut et du bas de l'ovaire, respectivement). Quatre jours après la pollinisation, une faible coloration de la vacuole centrale de l'endosperme est accompagnée d'un signal fort au niveau de la zone chalazale (figure 50 H).

L'expression d'*AtABCC13* a été également étudiée au cours de la maturation des siliques (figure 51 A). Nous avons remarqué que l'activité GUS a été initialement observée dans l'ensemble des graines en développement, ensuite la coloration bleue va en diminuant, au fur et à mesure que les siliques deviennent matures, pour qu'à la fin soit restreinte au funicule (figures 51 A, B). La section des siliques révèle qu'*AtABCC13* est exprimé dans le tégument

de la graine, au niveau de l'embryon au stade globulaire (figure 51 C) et durant un stade très précoce de l'embryogénèse « le stade cœur » (figure 51 D). Selon Nawy *et al.* (2008), la coloration GUS observée dans la partie centrale de l'embryon au stade globulaires et au stade cœur pourrait correspondre aux tissus provasculaires. Ceci indiquerait que, comme pour les plantes adultes, l'expression d'*AtABCC13* est également associée à la mise en place du système vasculaire pendant les étapes précoces du développement embryonnaire. Dans les graines fraîchement récoltées, l'expression d'*AtABCC13* est limitée à la chalaze associée au tégument (figure 51 E). Le signal est maintenu plus de quatre mois après maturation (données non présentées).

Aucune coloration GUS n'est visible lorsque les graines fraîchement récoltées sont imbibées 24 heures à l'eau, un traitement nécessaire pour la levée de la dormance des graines d'*Arabidopsis* Col-0 (figure 51 F i) (Finkelstein *et al.* 2008). Par la suite, *AtABCC13* est exprimé durant toutes les étapes de la germination des graines (figures 51 F ii-iv). Après 12 heures sur milieu MS (0.5x) à 22°C, une coloration bleue apparaît à l'intérieur de la graine dans la zone radiculaire (figure 51 F ii) et se maintient jusqu'à la rupture du tégument et l'émergence de la radicule (figures 51 F iii-iv). Les figures 51 G (i à iii) montrent que pendant la germination, l'expression d'*AtABCC13* est localisée près les faisceaux vasculaires de l'hypocotyle et de la radicule avec un signal fort observé au niveau de l'apex racinaire. A ce stade (figure 51 G ii) nous n'avons pas observé de marquage dans les cotylédons, et ce n'est qu'après 3 jours que les nervures des cotylédons apparaissent légèrement bleus (figure 51 G iii). L'expression d'*AtABCC13* pendant la germination des graines est bien compatible avec les effets répresseurs et régulateurs de l'ABA et l'AG respectivement (figures 51 B, D) ; alors que l'ABA maintient la dormance des graines l'acide gibbérellique antagonise cette action et favorise la germination des graines (Rodríguez-Gacio *et al.* 2009).

On voit de ce qui précède qu'*AtABCC13* est exprimé au cours des premières étapes du développement des graines et pendant la germination ; ces processus sont fortement associés au stockage et la mobilisation des réserves dans les graines (Penfield *et al.* 2005 ; Baud *et al.* 2008). Par ailleurs, nous avons observé dans tous les stades de développement des graines (figures 50 F, H ; figures 51 B, E), une forte activité GUS dans la zone chalazale. Bien que la fonction physiologique de ce tissu soit peu documentée certains travaux l'impliquent dans l'apport des éléments nutritifs dans la graine en développement (Hirner *et al.* 1998).

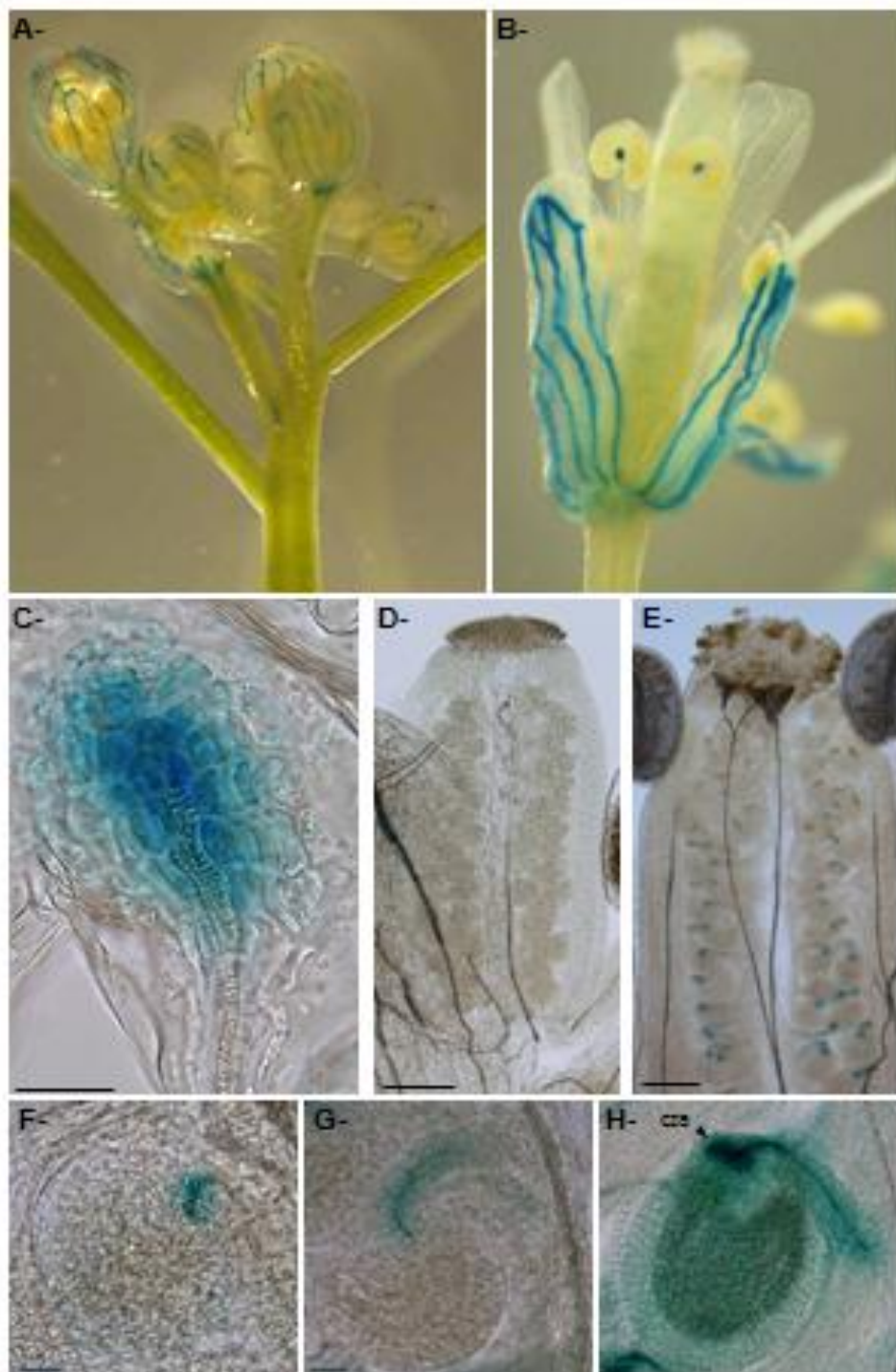


Figure 50: Expression d'AtABCC13 dans les organes reproducteurs.

A- coloration GUS au niveau des boutons floraux; **B-** fleur mature; **C-** Détail du point bleu au niveau de l'étamine montré en B; **D-** Gynécée avant pollinisation; **E-** Gynécée après pollinisation; **F, G, H-** Premiers stades de développement de la graine. cza, zone chalazale. Barres d'échelle: C, 10 μ M, D, E, 250 μ m, F, G et H, 20 μ m.

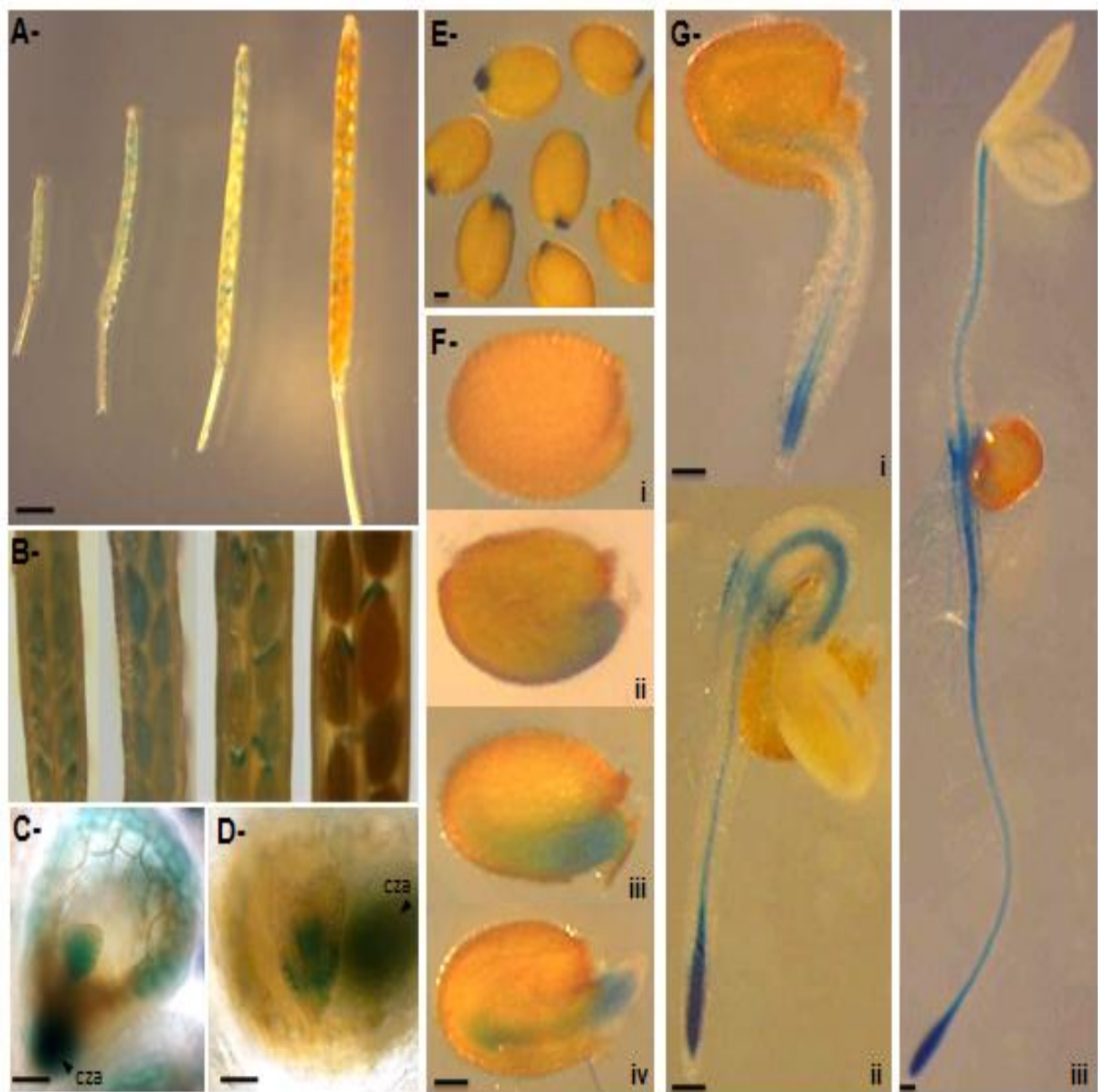


Figure 51: Expression d'AtABCC13 au cours du développement, maturation de la graine et au cours de la germination

A- différents stades de développement d'une silique; **B-** détails des siliques indiquées dans A; **C-** Développement embryonnaire chez *Arabidopsis thaliana*: embryon au stade globulaire. **D-** embryon au stade coeur. **E-** les graines fraîchement récoltées à partir des siliques matures. **F-** germination des graines après une imbibition de 24h (i), avant la rupture de la testa (ii), rupture de la testa (iii); émergence de la radicule (iv). **J-** Expression au cours du développement de la germination d'*Arabidopsis*: élongation radiculaire (i), émergence des cotylédons (ii), les cotylédons en expansion (iii). cza, zone chalazale. Barres d'échelle: A, 1,5 mm, C et D, 50 μ m, E et F (I-IV), 100 μ m.

❖ *Traitements nutritionnels influençant l'expression d'AtABCC13*

Afin de vérifier si un apport nutritif pourrait modifier l'expression d'*AtABCC13*, les mesures de l'activité GUS par spectrofluorimétrie sur des germinations transférées sur des milieux de culture contenant des concentrations croissantes de trois macroéléments majeurs ont été réalisées. L'activité GUS mesurée par spectrofluorimétrie montre que le nitrate et le phosphate (figures 52 A, B) régulent positivement et de façon significative l'expression d'*AtABCC13* alors que le sulfate n'avait pas d'effet significatif sur l'expression du gène (figure 52 C).

La question qui se pose ici est : quel est le rapport entre ces molécules et jusqu'à quel point l'étude de ces minéraux peut nous donner une idée sur la fonction d'*AtABCC13* ?

Chez *Arabidopsis thaliana*, la carence en phosphate inhibe l'élongation de la racine primaire, stimule celle des racines secondaires ainsi que la formation de poils absorbants (Miura *et al.* 2005). Nos résultats montrent que l'expression d'*AtABCC13* au niveau de la zone de transition de la racine lors de la différenciation des tissus pré-vasculaire et la mesure spectrofluorimétrique montre que le phosphate module positivement l'expression du gène ce qui suggèrent que ce transporteur pourrait être impliqué dans l'homéostasie du phosphate dans la plante.

D'autre part, la présence du nitrate dans le milieu augmente l'expression d'*AtABCC13*. Le nitrate est une molécule qui déclenche l'induction des gènes requis pour son utilisation en tant que source d'azote, y compris une partie de ses propres transporteurs membranaires et les enzymes assimilateurs (Lejay *et al.* 1999 ; Wang *et al.* 2004 ; Widiez *et al.* 2011). Linkohr et ses collaborateurs (Linkohr *et al.* 2002) ont montré que chez *Arabidopsis* les changements dans la disponibilité et de la distribution du nitrate et du phosphate ont des effets différents même contrastés sur la longueur de la racine primaire et la densité des racines latérales, bien qu'il y ait des effets similaires sur la longueur des racines latérales. La présence d'*AtABCC13* au niveau du cambium fasciculaire actif et au niveau de la zone de formation du péricycle de la racine secondaire, montre qu'*AtABCC13* pourrait être impliqué dans le transport ou le chargement des nitrates ou deux composés associés dans les tissus pré-vasculaires de la racine. Sitons à titre d'exemple, le cas du transporteur NRT2.1 d'*Arabidopsis thaliana*, transporteur de haute affinité au nitrate, qui fonctionne à des faibles concentrations externes et qui est aussi associé à l'initiation des racines latérales (Bertoni, 2012), ou encore le cas du

transporteur NRT1.9 impliqué dans le transport des nitrates au niveau du phloème (Waang et Tsay, 2011). Chez *Arabidopsis* parmi les 52 transporteurs de nitrate type NRT1 (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), NRT1.5 qui est exprimé au niveau des cellules de péricycle de la racine, est responsable du chargement du nitrate dans le xylème (Canivenc, 2005 ; Lin *et al.* 2008). Le transport des nitrates est variable en fonction de la concentration en nitrate dans le milieu. Cette variation suggère l'existence de plusieurs mécanismes ou types de transports correspondant à plusieurs cinétiques de saturations.

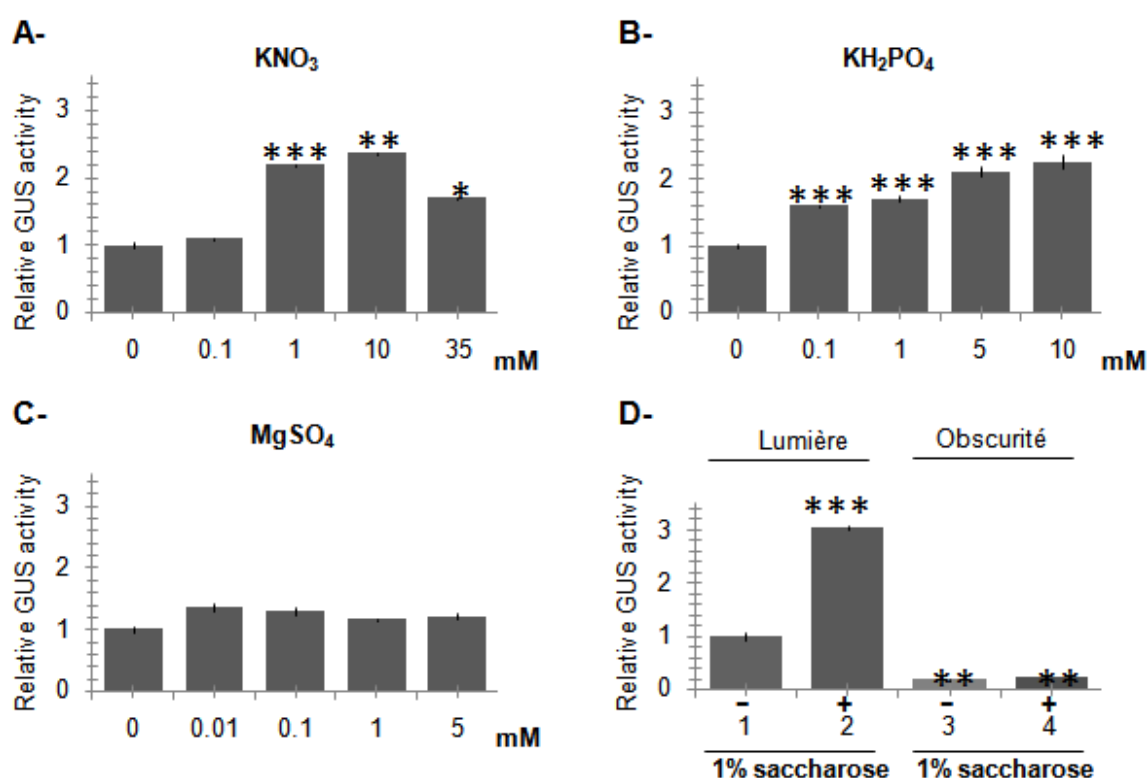


Figure 52: Régulation nutritionnelle d'AtABCC13.

Les germinations âgées de quatre jours ont été transférés pendant cinq jours sur milieu MS (0.5x) (voir Matériel et Méthodes) supplémenté de concentrations croissantes de nitrate, phosphate ou de sulfate, et 6 jours sur milieu avec saccharose. A, Nitrate (KNO₃); B, Phosphate (KH₂PO₄); C, Sulfate (MgSO₄); D, saccharose, en présence et en absence de lumière. L'activité GUS obtenue sans les nutriments testés, est utilisée comme référence (moyenne $\pm$ écart-type). Les astérisques indiquent que les différences sont significatives par rapport à la référence, selon les tests t de Student tests (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

La régulation nutritionnelle de l'expression d'*AtABCC13* suggère une fonction potentielle directe ou indirecte dans le transport des nutriments, qui est en accord avec l'expression associée à la chalaze illustrée dans les figures (50 E-H, 51 A-E) et laisse penser que l'expression d'*AtABCC13* est liée à la gestion des nutriments au cours des processus de développement. Chez la plante, la photosynthèse est un processus bioénergétique nécessitant la présence de lumière pour synthétiser les sucres, elle produit également le pouvoir réducteur et l'énergie chimique (le NADPH et ATP) nécessaire à l'assimilation des minéraux. Afin de vérifier si le sucre ou la lumière peuvent modifier l'expression d'*AtABCC13*, les germinations ont été cultivées sur un milieu avec ou sans sucre, en présence et en absence de lumière (figure 52 D). Nous avons remarqué que le saccharose modifie fortement l'expression d'*AtABCC13* d'une manière lumière dépendante (figure 52 D). En effet, sous l'effet de la lumière, le niveau d'activité GUS est trois fois supérieur en présence de sucre que sans saccharose tandis qu'en obscurité, l'activité GUS est fortement réduite avec un faible effet de saccharose.

Nous remarquons que l'expression d'*AtABCC13* est fortement modulée par la lumière et dans une moindre mesure par la présence de sucre dans le milieu. Ce profil d'expression peut traduire une implication du transporteur dans l'assimilation des nutriments plutôt que dans leur transport. Son expression, en relation avec les apports nutritionnels, peut-être mis en relation avec la mise en place des vaisseaux conducteurs associée à une bonne assimilation métabolique, favorisant la croissance ou le développement de la plante.

3.1.2.2. Eléments cis-régulateurs du promoteur d'*AtABCC13*

L'analyse *in silico* de la séquence nucléotidique du promoteur d'*AtABCC13* a été entreprise afin d'identifier les éléments *cis* régulateurs potentiels. Cette analyse a été réalisée en se basant sur les outils de détection PLACE, quelques articles de référence (Cf tableau 13) et en se focalisant sur les éléments compatibles avec le profil d'expression déterminé pour les tests histochimiques GUS. Les résultats obtenus révèlent la présence de deux groupes de boîtes régulatrices : des boîtes nutritionnelles et des boîtes hormonales (figure 53).

L'investigation de la région régulatrice juste en amont du site d'initiation de la transcription d'*AtABCC13* montre que les boîtes hormonales sont les moins nombreuses. Ces boîtes sont composées principalement de deux boîtes de réponse à la gibbérelline localisées respectivement en position -257 et -1858 ; une CACATG box de réponse à l'ABA ; deux

éléments associés au xylème situés en position -962 (TTCTTTGT) et -1494 (ACAAAGAA) et trois cis-éléments liés au stockage des protéines dans la graines situés respectivement dans les positions -329 (TAAAAAC), -905 et -1047 (GTTTTTA) (tableau 13). Les boîtes nutritionnelles sont les plus nombreuses et sont réparties tout au long de la région promotrice. On dénombre trois types de consensus spécifiques au phosphate situés dans les positions suivantes -247, -727 et -1375 respectivement pour le type 1 (CACGTC), type 2 (TATAAATA) et le type 3 (TACAAATTCAT) ; une TATCCA box spécifique de la réponse au sucre localisée dans les positions -97 et -709 (tableau 13). Fait intéressant, treize boîtes nitrate ont été identifiées. Les boîtes nitrate correspondent à différentes séquences consensus qui semblent être nécessaires au phénomène de la transcription dépendante des nitrates (Hwang *et al.* 1997). En outre, six des sept boîtes nitrate (type 1) sont situées dans la région promotrice entre 0 et -650. Ces résultats prédictionnels suggèrent un rôle majeur du nitrate dans la régulation d'*AtABCC13*. Plusieurs études révèlent que l'analyse du profil d'expression des transporteurs ABC de plantes pourrait contribuer à identifier leur fonction physiologique. Par exemple, chez le tabac, *NpABC1/NpPDR1* est impliqué dans la sécrétion de composés terpéniques comme le sclaréol impliqué dans la défense des plantes (Jasinski *et al.* 2001). La caractérisation fonctionnelle de promoteur de *NpABC1/NpPDR1* a permis l'identification des boîtes sclaréol qui sont nécessaires à l'induction de l'expression par le sclaréol de ce transporteur suite à l'attaque pathogène (Grec *et al.* 2003 ; Stukkens *et al.* 2005). D'autre part, l'identification des éléments cis régulateur en relation avec la carence en fer dans le promoteur de *NtPDR3* du tabac a permis de mettre en évidence l'implication des transporteurs ABC de plantes dans l'homéostasie du fer (Ducos *et al.* 2005). Pour le maïs, le promoteur du transporteur d'anthocyanines *ZmMRP3*, possède des éléments ARE (*Anthocyanin Responsive Element*) ; l'analyse détaillée du profil d'expression de *ZmMRP3* montre que le gène est localisé dans les tissus accumulant les anthocyanes afin de générer une protection contre les UV (Goodman *et al.* 2004). *ZmMRP3* est également sous la régulation directe de C1, un facteur de transcription de type MYB, régulant la synthèse des anthocyanes chez le maïs (Dooner *et al.* 1991).

Definition		Consensus	Motif AtABCC13	Location
Nitrate box	Type 1	ASTCA ¹	AGTCA	-193, -199, -381
	Type 2		ACTCA	-427, -632
			TGAGT(r)	-259, -1230
		TTTAGTTACTCA ¹	TTTAGTTACTTA	-1564
		CGAGTAAATAAA ¹	CGGGTAAATAGA	-735
		ATTAAAAAGTCA ¹	ATTACAAATTCA	-1376
		TGACTTTTAAAT ¹	TGAGTTTAAAT	-1224
		TTAATCAAGTCA ¹	TTATTCAAGTTA	-856
		TGAATTAATTAA ¹	TGAATTTTAA	-1581
Phosphate box	Type 1	CACGTC ²	CACGTC	-247
	Type 2	TATAAATA ²	TATAAATA	-727
	Type 3	TACAAATTCAT ²	TACAAATTCAT	-1375
Sugar response		TATCCA ²	TATCCA	-97, -709
Gibberelin response	Type 1	CCTTTT ²	CCTTTT	-1858
	Type 2	GATGAYRTGG ²	GATGAGTGG	-257
ABA regulation		CACATG ²	CACATG	-756
Core xylem gene set		ACAAAGAA ²	ACAAAGAA	-1494
			TTCTTTGT(r)	-962
Storage protein		RTTTTTR ²	GTTTTTA	-905, -1047
			TAAAAAC(r)	-329

Tableau 13: Localisation des différents éléments régulateurs putatifs situés dans la région en amont du site d'initiation de la transcription d'*AtABCC13*.

Les séquences complémentaires sont indiquées avec (r). ¹Hwang *et al.* 1997. ²Selon les prédictions du site PLACE: <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html> (Higo *et al.* 1999).

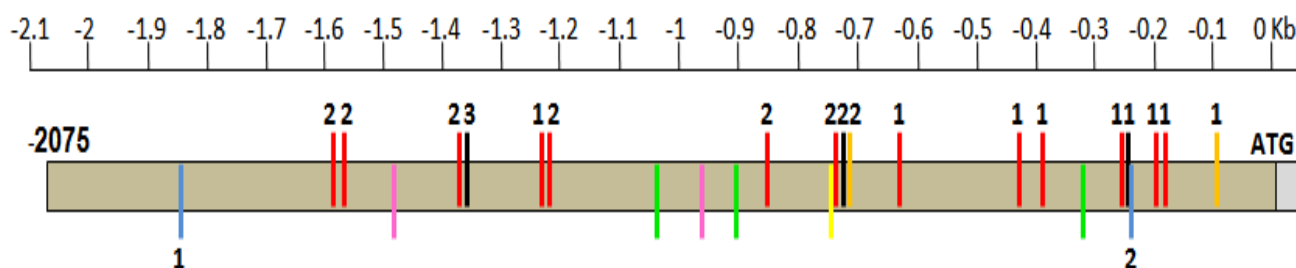


Figure 53: Localisation des différents éléments cis régulateurs potentiels situés dans le promoteur d'*AtABCC13* en amont du 1er ATG.

En haut, les boîtes nutritionnelles; en bas, les boîtes hormonales; 1, 2 et 3 indiquent les séquences consensus de type 1, 2 ou 3 indiquées dans le tableau 12; les boîtes de nitrate (rouge); les boîtes de phosphate (noir); boîte de réponse au sucre (orange); boîtes de réponse aux gibberellines (bleu), boîte de régulation d'ABA (jaune); boîte de régulation du xylème (rose), protéine de stockage (vert).

3.1.3. Etude des lignées knock-out (KO) pour *AtABCC13*.

3.1.3.1. Etablissement des lignées homozygotes des KO *AtABCC13*

La résistance médicamenteuse de l'orthologue humain ABCC10 (Naramoto *et al.* 2007 ; Bessho *et al.* 2009 ; Pushpakom *et al.* 2011) et le fait que d'autres transporteurs ABCC humains ont également été impliqués dans la résistance à une grande variété de composés cytotoxiques (Cui *et al.* 1999 ; Guo *et al.* 2003), ont conduit à l'hypothèse que *AtABCC13* peut aussi avoir une fonction dans les réponses de plants d'*Arabidopsis* exposés aux composés génotoxiques et cytotoxiques, notamment dans le processus de détoxification. Afin de tester si *AtABCC13* confère la résistance *in vivo* à des composés appliqués de manière exogène et d'essayer de déterminer sa fonction dans la plante, des mutants d'*Arabidopsis* pour *AtABCC13* ont été exposés à une large gamme de xénobiotiques, des composés physiologiques mais aussi et à des conditions de culture varié correspondant à des stress abiotiques. Compte tenu de la forte expression d'*AtABCC13* dans les cellules du péricycle de l'apex racinaire et la chalaze des graines, plusieurs conditions expérimentales ont porté sur la germination des graines et des mesures d'elongation racinaire.

L'établissement de lignées mutantes pour *AtABCC13* a été facilitée par l'existence de mutants d'insertion disponibles dans les banques de graines d'*Arabidopsis*, notamment au Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC) (figure 54 A). Les graines ont été semées et les

plantes menées à fleurs pour l'autofécondation (figure 54 B). Le génotypage des plantes a été effectué par PCR en duplex, en mélangeant dans le mix PCR les amorces d'un gène de ménage (UBC) avec les jeux d'amorces spécifiques encadrant la position de l'insertion du T-DNA (KO1 ou KO4, figure 55 A). L'ADN génomique est préparé à partir de plantes identifiées individuellement (numérotées de 1 à 14). Lors de la PCR en duplex, on s'attend à une amplification du fragment UBC (648 pb) et du fragment encadré par les amorces KO1 (400 pb) ou KO4 (390 pb) pour les génotypes sauvages et hétéozygotes, et un seul produit PCR UBC pour les lignées KO. Le premier génotypage portant sur quatorze plantes développées directement à partir des graines fournies par le NASC a permis d'identifier trois lignées homozygotes pour KO1 et deux lignées homozygotes pour KO4 (figure 55 A). Une lignée homozygote pour chaque génotype a été choisie pour la production de graines homozygotes et un nouveau criblage a été effectué sur la descendance (figure 55 B). Enfin, l'expression d'*AtABCC13* sur les lignées homozygotes KO1 et KO4 a été évaluée par RT-PCR. Alors qu'un signal est obtenu avec les ARN de la lignée sauvage et sur ADN génomique, aucun signal n'est détecté pour la RT-PCR menée sur des ARN extrait des plantes homozygotes KO1 et KO4 (figure 55 C). Les lignées KO1 et KO4 établies ont été utilisées par la suite pour les tests physiologiques visant à cerner la fonction d'*AtABCC13*.

A ce stade, aucun phénotype particulier n'a pu être observé durant un cycle de vie complet (graines à graines) des mutants KO d'*AtABCC13* comparés aux plantes sauvages.

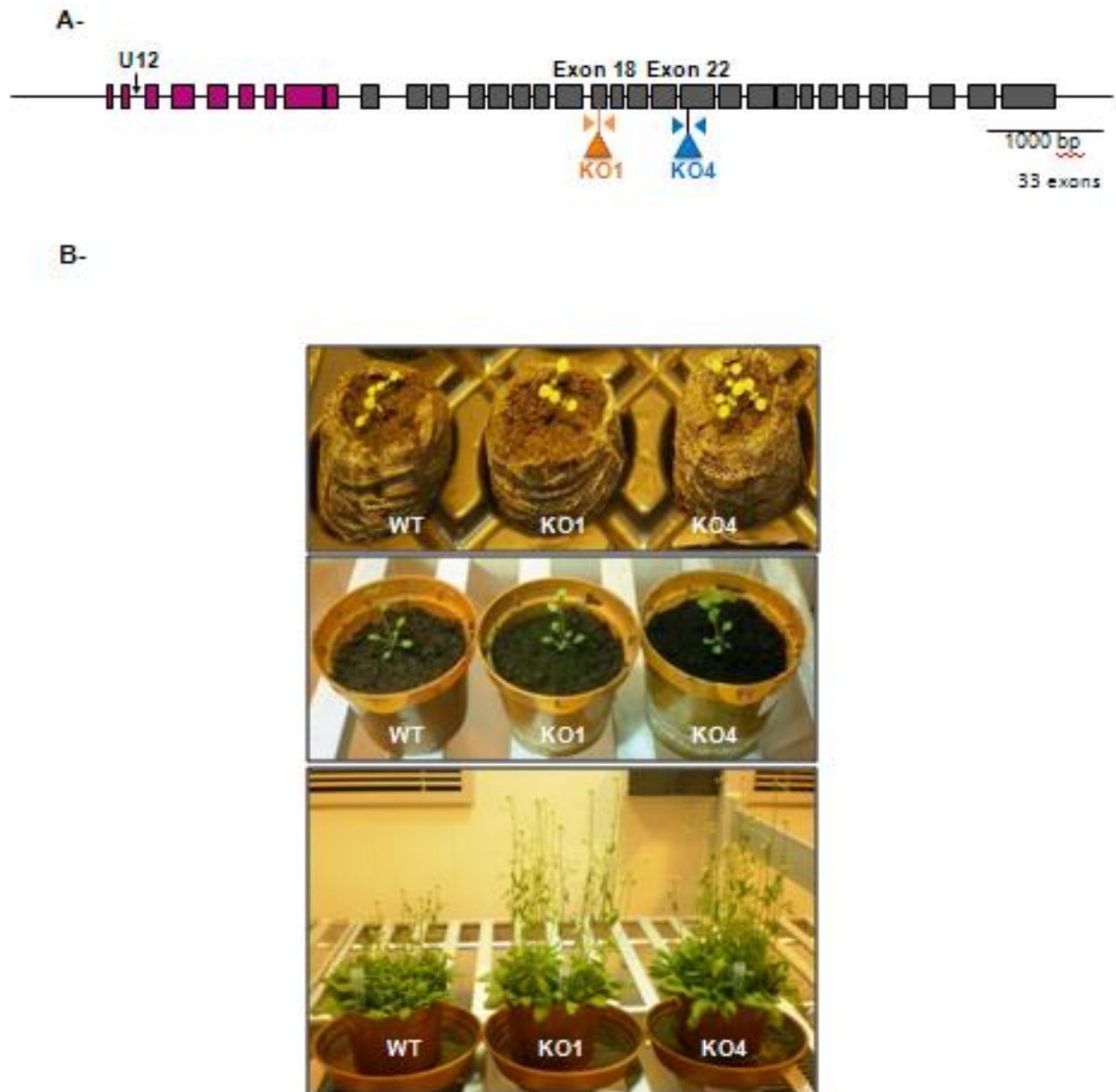


Figure 54: Organisation génomique d'AtABC13 et étapes nécessaires à l'obtention des plantes homozygotes.

A- Organisation génomique d'AtABC13 : La partie en rose correspond à l'extension ajoutée par comparaison au gène *CrMRP1*. La position de l'insertion des T-DNA des lignées *knock-out* et les amorces spécifiques désignées pour le génotypage sont indiquées (KO1 et KO4). La position de l'intron de type U12 est indiquée. **B-** Etapes nécessaires à l'obtention des plantes homozygotes. Les graines des WT, KO1, KO4 ont été semées dans des pastilles de tourbes et les plantes menées à fleurs pour l'autofécondation

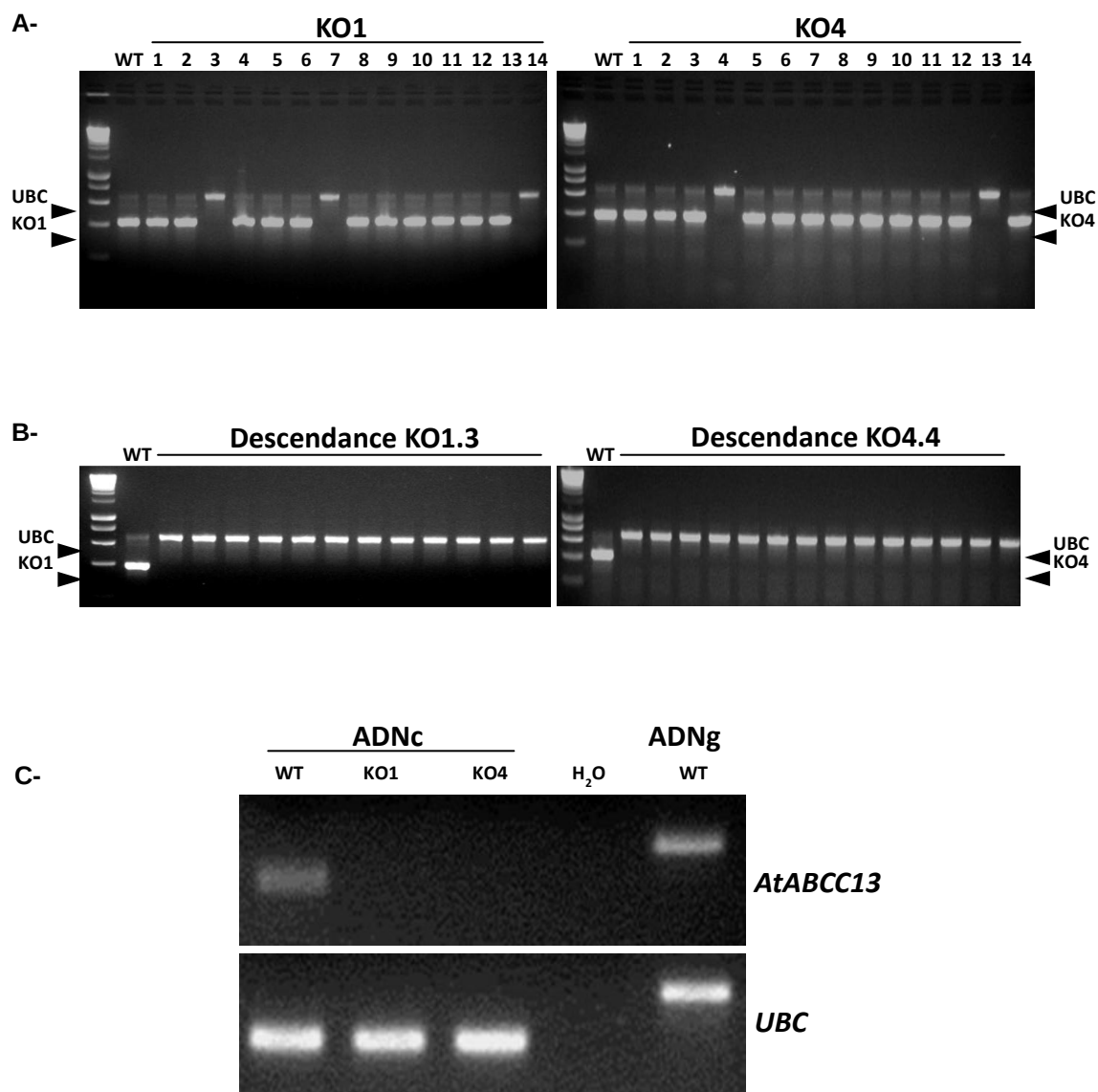


Figure 55: Etablissement des lignées homozygotes des Ko *AtABCC13*

A- Génotypage des premiers semis des graines du NASC. PCR en duplex avec les amorces UBC et spécifiques aux KO1 ou KO4 (indiquées figure 51A). **B-** Génotypage des descendants homozygotes déterminés figures 52A. **C-** Evaluation du niveau d'expression d'*AtABCC13* par RT-PCR sur de l'ARN de feuille des deux lignées KO homozygotes KO1 et KO4. Les amorces correspondant au produit d'amplification *AtABCC13* correspondent à l'amorce située en 5' de l'insertion KO1 (amorce sens) et l'amorce située en 3' de l'insertion KO4 (amorce antisens) localisée figure 51A.

3.1.3.2. Tests de croissance

Les graines des KO *AtABCC13* sont utilisées pour effectuer des tests de croissance racinaire ou de germination sur milieux de culture gélosés complémentés par différents composés. Ces mesures nous ont permis d'évaluer la sensibilité des lignées mutantes comparées à la lignée sauvage vis-à-vis des drogues incorporées dans le milieu. Ces tests sont un moyen rapide et sensible pour évaluer le comportement des KO dans différentes conditions de culture. En effet, différentes concentrations de différents traitements selon quatre différentes méthodes ont été testées sur les graines d'*Arabidopsis*, à savoir :

-méthode 1 : culture sur milieu gélosé en plaque 96 puits. Une 10aine de graines est déposée dans les cupules contenant 300 μ L de milieu gélosé avec traitement. Cette méthode permet d'évaluer la germination et le jaunissement des cotylédons en présence d'une drogue. Elle permet de travailler sur des petites quantités de produit avec de nombreuses dilutions.

-méthode 2 : boîte de Pétri placée verticalement. Elle permet une mesure quantitative de l'allongement racinaire des germinations mais avec un faible nombre d'individus (5-7).

-méthode 3 : germination sur Petri. Permet d'évaluer le taux de germination sur un grand nombre d'individus et suivre la survie des germinations, le jaunissement des cotylédons.

-méthode 4 : germination 5 jours sur milieu sans traitement, ensuite transfert sur boîte avec traitement. Permet de s'affranchir de l'inhibition de la germination par certains composés et effectuer des mesures d'allongement racinaires.

Dans cette approche, l'ensemble des résultats obtenus, résumés dans le tableau 14, n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre le phénotype des plantes sauvages et des mutants dans les conditions testées. La figure 56 montre quelques exemples d'allongement racinaire avec divers traitements (phytohormones, traitements composés toxiques composés inducteurs de stress etc). Sur la base d'une observation plus globale, dans des conditions de cultures standard, les plantes KO d'*AtABCC13* et sauvages sont qualitativement identiques à l'égard de la dormance des graines, la germination, le développement des semis, l'aspect de la plante, le taux de croissance, la longueur des racines, la formation de racines latérales, la période de floraison, la production de semences et la sénescence. L'absence de phénotype identifié dans cette étude pourrait être expliquée par l'étude effectuée par Hanada *et al.* (2009), qui a montré que le « *Knocking out* » du gène à

partir du génome ne provoque souvent aucun effet phénotypique. Hanada *et al.* (2009) ont examiné les changements phénotypiques chez 3871 mutants knockout d'*Arabidopsis* et ont constaté des changements phénotypiques dans seulement 253 gènes. En outre, d'autres recherches ont prouvé l'existence de 1489 gènes dont les mutants knock-out manifestaient des changements phénotypiques et ils ont constaté que les gènes dont les mutants (KO) ont montré les phénotypes les plus marquants ont tendance à être plus anciennement dupliqué, tandis que ceux dont les mutants knock-out ont montré des phénotypes moins importants sont les plus récemment dupliqués. Cette constatation renforce l'idée que la compensation fonctionnelle des gènes montrant des phénotypes plus sévères tend à persister pendant une longue période, alors qu'elle tend à disparaître rapidement chez les gènes dont les KO ont des phénotypes moins sévères. Ainsi, cette relation entre l'âge de duplication et la signification phénotypique soutient l'hypothèse que la sélection naturelle affecte la persistance de compensation fonctionnelle (Hanada *et al.* 2009). Cette conclusion est similaire à celle des nématodes et de levure, mais différente de celle de la souris (Gu *et al.* 2003 ; Conant et Wagner, 2004 ; Liang et Li, 2007 ; Liao et Zhang, 2007). En effet, chez la souris, il a été montré que les gènes dupliqués sont aussi essentielles que les gènes existant en seule copie. Parce que la souris est un organisme plus complexe que les nématodes et la levure, il a été proposé que les gènes dupliqués de souris puissent avoir tendance à subir une divergence fonctionnelle au lieu de la préservation de la compensation fonctionnelle (Zhang, 2003). D'autre part, les souris transgéniques chez lesquelles *MmABCC10*, l'orthologue d'*AtABCC13*, a été muté ont été signalées être en bonne santé et ne présentent pas de phénotype observable dans des conditions normales d'élevage (Hopper-Borge *et al.* 2011).

La présence des orthologues d'*AtABCC13* (clade III des ABCC) en une seule copie chez les plantes, la quasi-totalité des animaux et certaines espèces spécifiques de protozoaires indiquent des fonctions conservées, au moins en partie, d'*AtABCC13* dans les processus universels d'évolution précoce. La forte sélection contre la duplication d'*AtABCC13* tout au long de son évolution pourrait être le résultat des contraintes du dosage du gène (Veitia *et al.* 2008). En effet, il a été démontré que les déséquilibres du dosage des composants multi-protéiques résultant des duplications de gènes peuvent être délétères et diminuent l'avantage sélectif (Veitia, 2002 ; Papp *et al.* 2003 ; Veitia *et al.* 2008).

Traitement	Concentration	Méthode	Effet WT/KO
Acide abscissique (μM)	0.05, 0.5 , 1 , 5	3	aucun
Acide indole 3 -acétique (μM)	2*,0.2*	2	aucun
Acide naphthalène acétique (μM)	0.5, 1, 5, 10		
6 benzylamino purine: 6-BA(μM)	0.1*, 1*, 1 quand c'est directement sur boîte avec traitement	2,4	aucun
Acide gibberelique (μM)	1, 5, 10	3	aucun
Acide salicylique (μM)	25, 250	2	aucun
Méthyle jasmonate	25, 100, 250		
Vindoline (μM)	5, 10, 25, 50, 100, 250 , 500	1	aucun
Vinblastine (μM)	5, 10, 25, 50, 100 , 250 , 500	1	aucun
Méthotrexate (μM)	10 , 100	2	aucun
NaCl (mM)	10, 20, 30, 40, 50, 75 , 100 , 150 , 200 , 300	1, 2, 3	aucun
Mannitol (mM)	100, 150 , 200 , 300	1, 2, 3	aucun
KNO3 (mM)	5, 10, 50	2, 3	aucun
KH2PO4 (mM)	1, 2.5, 5, 10, 25	2	aucun
Glucose (%)	2, 5 , 10	2	aucun
EGTA (mM)	0,1, 1, 2, 5	2	aucun
Na EDTA (mM)	0,1, 1	2	aucun
Na EDTA/ Fe SO4 (mM)	0,1, 1	2	aucun
Na EDTA/ Cu SO4 (mM)	0,1, 1	2	aucun
Na EDTA/ Zn SO4 (mM)	0.05, 0.1, 0.25, 1	2	aucun
Na2 SO4 (mM)	0,1, 1, 2, 5	2	aucun
Mg SO4(mM)	1, 2, 5	2	aucun
Phytate (mM)	0.001, 0.005, 0.05, 0.25, 2.5*, 1*	2, 4	aucun
Méthylviologène	5 , 50	2	aucun
H ₂ O ₂ (mM)	1 , 5	2	aucun
Myo inositol (mM)	0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5	2	aucun
CdCl ₂ (μM)	1, 2.5, 5, 10 , 25 , 50 , 100	1	aucun
p H 3.6		2,4	aucun
p H 4		2, 4	aucun
p H 8		2	aucun

Tableau 14:différents traitements testés sur les graines d'Arabidopsis.

Méthode: (1) culture en 96 puits; (2) Petri verticale (*Root growth assay*); (3) Germination sur Petri; (4) 5 jours sur milieu MS, ensuite transfert sur boîte avec traitement. (*) Réduction de la croissance. GRAS : inhibition de croissance. GRAS SOUS-LIGNE : inhibition de germination et/ou létalité >10 jour. 6-BA: 6 benzylamino purine.

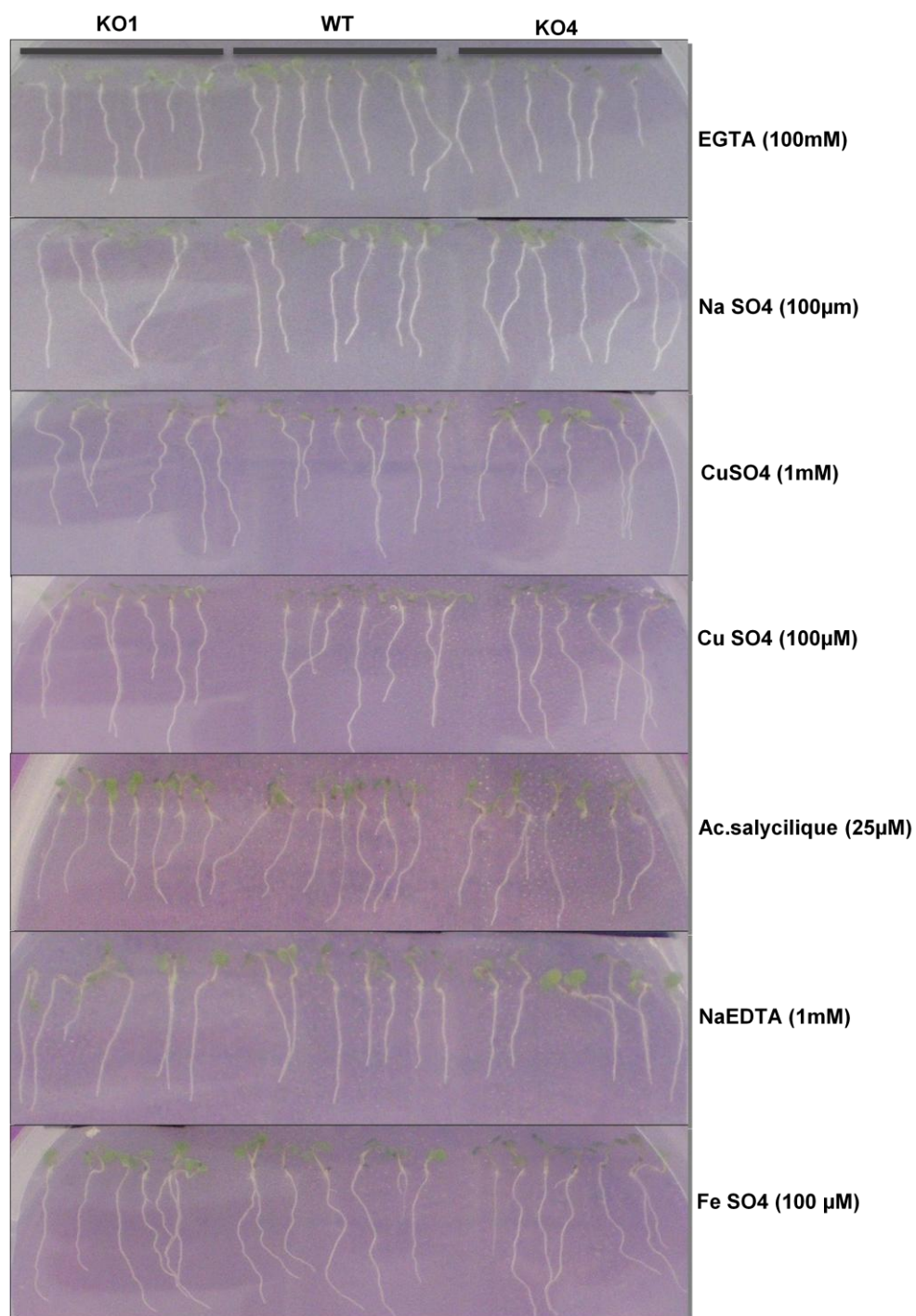


Figure 56:Exemple de résultats de tests de croissance racinaire sur milieux de culture gélosés complémentés par différents composés.

3.1.3.3. Coloration histochimique du phosphate libre

Récemment quelques tests préliminaires ont été menés et les résultats obtenus sont prometteurs quant-à la caractérisation du phénotype des KO *AtABCC13*. Parce que l'expression d'*AtABCC13* est modulée par l'approvisionnement en nutriments, notamment le phosphate, des expériences de dosage de phosphate ont été menées sur les KO *AtABCC13*. La coloration histochimique du phosphate libre par le molybdate d'ammonium directement sur les plantes a mis en évidence un marquage plus prononcé au niveau des vaisseaux conducteurs des siliques des lignées *knock-out* comparé à la lignée sauvage (figure 57 A). La dissection des siliques montre que la coloration est principalement visible au niveau du septum, une cloison qui sépare les deux valves des siliques (figure 57 B). Observés dans le détail, on s'aperçoit que le marquage affecte les parties vascularisées entourant le septum ainsi que les funicules (figure 57 C), des canaux qui alimentent les graines dans les siliques pendant leur maturation. Cependant, la haute teneur en acide sulfurique de la solution de coloration a partiellement dégradé les tissus et l'identification précise de la localisation du phosphate libre a été rendu impossible. Toutefois, elle correspond à une région où l'expression d'*AtABCC13* a été détectée par les analyses GUS histochimique (figure 58).

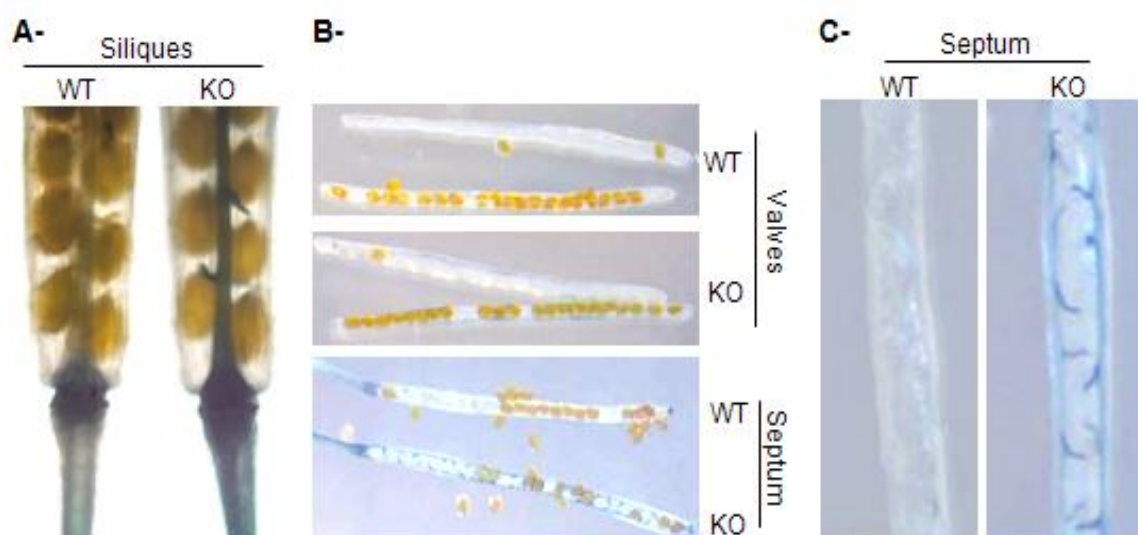


Figure 57:Coloration histochimique du phosphate libre dans les siliques.

A- Pédoncules et siliques. **B-** Siliques disséquées (valves et septum). **C-** Détail du septum et des funicules montrés en B. WT, lignée sauvage; KO, lignée KO1 d'*AtABCC13*.

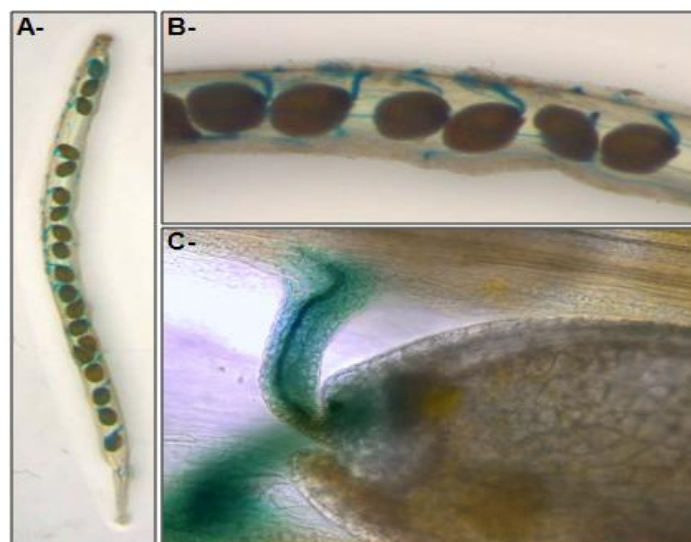


Figure 58:Coloration Gus d'AtABCC13 dans les siliques.

Coloration rappelant la coloration histochimique du phosphate. **A-** Siliques disséquées. **B-** détail de A. **C-** Détail du funicule

AtABCC13 étant fortement exprimé pendant la maturation des graines, le phosphate a été dosé dans différents lots de graines KO et sauvages obtenus au cours des années de thèse. Le phosphate est libéré des graines matures par une incubation de 16h dans une solution d'acide trichloracétique (TCA : 12,5%) ; la coloration par le molybdate d'ammonium est directement effectuée sur ces extraits et les résultats sont exprimés en nanomoles de phosphate par mg de graines par rapport à une courbe étalon, selon une procédure décrite par (Kristin *et al.* 2008). Les résultats des dosages montrent que les graines KO libèrent 2 à 8 fois plus de phosphate que les sauvages selon les lots de graines âgées d'un an, 9 mois et 24 jours et âgées de 2 ans, 4 mois et 19 jours respectivement (figure 59). La variabilité observée ici d'un lot à l'autre peut être due à l'âge des graines après récolte mais aussi aux variations des conditions de cultures des plantes qui a sensiblement changé pendant les années de thèse (changement de serre, température, hygrométrie, éclairage...). Toutefois, malgré ces variations, les graines des KO *AtABCC13* libèrent plus d'ions phosphate que les sauvages. Ces résultats suggèrent que l'abolition de l'expression d'*AtABCC13* affecte l'homéostasie du phosphate au niveau des siliques et du remplissage des graines. Par ailleurs, bien que la méthode de marquage du phosphate utilisée puisse ne pas être spécifique au phosphate puisqu'elle réagit avec l'arséniate, on peut raisonnablement penser que dans la plante la

présence d'arsénique est négligeable par rapport au phosphate. Enfin, cette méthode de marquage histochimique et d'extraction du phosphate pour les graines (TCA) ne s'applique pas à tous les tissus végétaux testés et ne permet pas de discerner les différentes formes de phosphates présentes dans la plante.

Paulik *et al.* (2005) montre que les graines possédant une faible teneur en phytate sont caractérisées par des niveaux élevés de phosphate inorganique. En effet, l'acide phytique est accumulée dans les graines sous forme d'un mélange de sels de phytates de plusieurs cations tels que le potassium, le fer, le zinc, le magnésium, le phosphate (Raboy, 2002) au niveau des globuloïdes des vacuoles spécialisés chez *Arabidopsis* ainsi que chez les autres graines (Otegui *et al.* 2002). Pendant la germination des graines, cette molécule est dégradée par l'activité des phytases libérant le phosphate libre, le myo-inositol et les cations, nécessaires pour la germination. Parce que les mammifères non-ruminants ne digèrent pas le phytate, la réduction de la teneur en acide phytique dans les graines et l'augmentation correspondante dans le niveau de phosphate libre été l'objectif de généticiens depuis les 20 dernières années (revue par Raboy, 2009). Une des solutions les plus prometteuses pour ce problème a vu le jour par l'isolement des mutations récessives provoquant une baisse importante de l'acide phytique au niveau des graines (Larson *et al.* 1998, 2000 ; Rasmussen and Hatzack 1998 ; Raboy *et al.* 2000 ; Wilcox *et al.* 2000 ; Hitz *et al.* 2002 ; Pili *et al.* 2003a ; Guttieri *et al.* 2004 ; Bregitzer and Raboy 2006 ; Liu *et al.* 2007 ; Champion *et al.* 2009). Les travaux de Hitz *et al.* (2002) confirment que comme décrit précédemment dans la littérature, les graines possédant une faible teneur en phytate sont caractérisées par des niveaux supérieurs à la moyenne en phosphate inorganique. A ce stade de l'observation, les dosages de phosphate réalisés ne permettent pas de distinguer le phosphate associé au phytate dans la graine, du phosphate libre dans les KO *AtABCC13*. Des travaux récents, ont montré que la perturbation du gène codant pour le transporteur ABC *ZmMRP4* réduit l'accumulation de l'inositol hexakiphosphate (IP6) dans les graines de maïs (Shi *et al.* 2007; Réka *et al.* 2009), ces résultats, indiquent que *ZmMRP4* est responsable du transport d'IP6 ou de son précurseur à travers la membrane vacuolaire des tissus de stockage de l'IP6 chez les graine de maïs (Réka *et al.* 2009). *ZmMRP4* est un homologue proche d'*AtMRP5* qui est très exprimé au niveau de la graine. Outre leur implication dans la régulation de l'ouverture des stomates, les mutants d'*AtMRP5* n'accumulent pas d'IP6 dans la graine, et la mesure du phosphate inorganique chez les mutants *mrp5*, révèle que la diminution d'inositol phosphate est accompagnée par une accumulation de phosphate inorganique libre (Réka *et al.* 2009). Ce contrôle qui n'est pas dû

à une accumulation de précurseurs métaboliques (Réka *et al.* 2009), montre bien l'importance du contrôle exercé par AtMRP5 dans l'accumulation d'IP6 au niveau de la graine ou dans les plantes entières. AtMRP5 appartient au clade II des ABCC chez Arabidopsis et de ce fait, partage peut d'homologie avec AtABCC13 (clade III) ; ceci suggère que ces deux transporteurs possèdent des fonctionnalités différentes mais peut-être en relation avec l'homéostasie du phosphate.

Etant donné que l'inositol hexakisphosphate est un composé de stockage du phosphate dans la plante, on peut penser qu'au niveau des plantes sauvages le phosphate est accumulé sous sa forme complexée, phytate, sous le control de processus encore non étudiée qui impliquent le transporteur AtABCC13 et qu'au niveau des mutants il y a eu une libération de phosphate libre qui expliquera l'augmentation de son taux par rapport au sauvage.

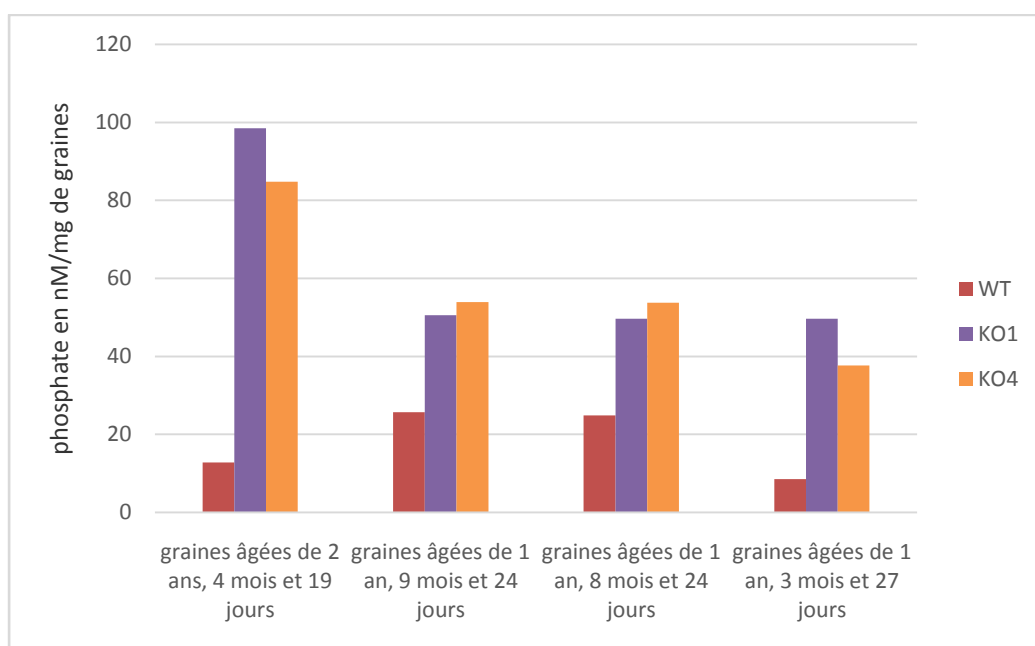


Figure 59: Dosage du phosphate libre dans différents lots de graines.

3.2. Conclusion

La caractérisation du clade III des ABCC/MRP débutée sur la plante modèle *C. roseus* s'est poursuivie sur *Arabidopsis thaliana*, un modèle plus simple d'utilisation pour le problème abordé. Cependant, la mise en place des outils moléculaires et génétiques indispensables à la caractérisation physiologique d'*AtABCC13* a nécessité beaucoup de temps, notamment pour les transformations génétiques, la régénération de plantes, les croisements, l'obtention de graines et de lignées homozygotes.

AtABCC13 d'*Arabidopsis* a été signalé comme étant phylogénétiquement distinct d'autres gènes ABCC d'*Arabidopsis* dans les études précédentes et la protéine était précédemment décrite sans extension TMD0 (Kolukisaoglu *et al.* 2002 ; Verrier *et al.* 2008 ; Wanke et Kolukisaoglu, 2010), cependant notre étude a pu mettre en évidence l'existence de cette extension amino-terminale, ce qui lui confère la topologie «classique » des ABCC.

A ce jour, aucune fonction physiologique ou moléculaire n'a été associée à ce gène, ni à ses orthologues dans d'autres espèces végétales. Cependant, le fait qu'*AtABCC13* appartient à un groupe conservé précoce de l'évolution de gènes ABCC suggère que ce gène possède des fonctions essentielles et évolutives conservées. Ainsi, il a été démontré que les redondances fonctionnelles conférés par d'autres ABCCs d'*Arabidopsis* seraient moins prononcées (Wanke and Kolukisaoglu, 2010) et que par conséquent un KO d'*AtABCC13* pourrait révéler des phénotypes distincts dans des conditions appropriées.

Le but de ce chapitre de thèse était de caractériser *AtABCC13* sur plan génétique et fonctionnel. L'investigation du profil d'expression d'*AtABCC13* révèle une relation claire avec les différents tissus impliqués dans les échanges métaboliques (système vasculaire, jonction du filament sur l'anthère, funicule/région chalazale des graines). *AtABCC13* est aussi modulé positivement par l'acide gibbérellique alors que la zéatine (cytokinine) et l'ABA le répriment. L'expression d'*AtABCC13* est également soumise à un contrôle nutritionnel complexe et à l'effet de lumière. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que ce transporteur ABC pourrait être impliqué dans la gestion et la circulation de certains nutriments en relation avec les tissus vasculaires où le gène est exprimé, et en rapport avec le développement des graines.

L'exploitation des lignées *knock-out* devra être complétée, notamment en clarifiant la relation entre *AtABCC13* et le phosphate, et explorer aussi les relations avec les autres

nutriments qui affectent l'expression du gène. Enfin, une analyse fonctionnelle d'AtABCC13 par expression hétérologue en levure permettrait de rechercher des substrats physiologiques pour ce transporteur ABC qui seront choisis en regard des résultats obtenus dans cette étude avec, par exemple, des composés impliqués dans la modulation de l'expression du gène ou la gestion des ressources nutritionnelles.

Chapitre V : Conclusion générale et perspective

Les transporteurs ABC sont des protéines largement caractérisées chez l'homme depuis des décennies pour leur implication dans les processus de chimiorésistances liés aux traitements anticancéreux. Les gènes codant pour ces protéines ont été aussi étudiés pour leur implication dans des maladies génétiques. Outre leur capacité de détoxification cellulaire, l'ensemble des études menées sur ces deux aspects, a mis en évidence l'importance de ces transporteurs dans de nombreux aspects de la physiologie humaine.

L'avènement de la génomique et le séquençage des génomes complets de plantes, a révélé que dans le règne végétal, cette famille multigénique s'était extrêmement diversifiée au cours de l'évolution et que les génomes de plantes renfermaient deux à quatre fois plus de gènes « ABC » que ceux des règnes animal et fongique. De nombreuses études tendent à décrypter les fonctions physiologiques des transporteurs ABC de plantes. Ils sont engagés dans une multitude de processus physiologiques spécifiquement liés au développement de la plante, à la détoxification cellulaire ainsi qu'à l'adaptation des plantes aux stress biotiques ou abiotiques. Ces gènes semblent avoir évolué pour remplir des fonctions spécifiques aux plantes et, bien que la mécanique du transport soit commune aux transporteurs ABC, les fonctions engendrées sont généralement différentes de celles décrites dans les autres règnes. Cependant aujourd'hui, la majeure partie des transporteurs ABC n'a pas encore été fonctionnellement caractérisée chez la plante.

Nous nous sommes intéressés à un clade phylogénétique particulier de la sous famille C (ABCC/MRP), le clade III qui contient des gènes de mammifères et des gènes de plantes. Cette singularité suggère que, contrairement aux autres ABC de plantes, dans ce groupe phylogénétique particulier, les règnes animal et végétal partagent une fonction commune portée par un ABC transporteur ayant évolué depuis un ancêtre eucaryote commun. L'unique membre humain de ce clade, ABCC10, a été caractérisé vis-à-vis de ses capacités des transports des drogues anticancéreuses dont font partie les vinca-alcaloïdes. Ces alcaloïdes sont exclusivement produits par la pervenche de Madagascar (*C. roseus*) qui les accumule en très faible quantité. Une façon d'améliorer les capacités d'accumulation de molécules d'intérêt pharmaceutique dans la plante serait d'améliorer ses capacités de stockage vis-à-vis de ses composés ; notamment en augmentant les flux de molécules vers les lieux de stockage (vacuole). Dans cette perspective, l'orthologue d'ABCC10 chez *C. roseus* a été isolé.

Dans un premier temps, nous avons démontré que *CrABCC1* est l'orthologue phylogénétique d'*ABCC10*. Il est apparu que contrairement aux autres sous-familles ABC de

plantes qui ont démultiplié leurs gènes par duplication, *CrABCC1* est l'unique représentant de son clade. L'évolution des gènes au niveau de ce clade s'apparente plus à l'évolution observée chez les animaux que chez les plantes. En effet, les génomes de plantes ont évolué sur plusieurs dizaine de millions d'années avec des étapes de polyploïdisation qui ont largement contribué aux duplications de gènes. *CrABCC1*, ou ses ancêtres, n'ont pas échappé à la règle mais vraisemblablement, les copies de ce gène ont été éliminées au cours de l'évolution pour ne maintenir qu'une copie par génome. Dans les autres plantes et les autres règnes, les orthologues de *CrABCC1/ABCC10* ne sont toujours présents qu'en une seule copie, ce qui semble indiquer que le maintien de plusieurs copies de ce gène soit délétère pour l'organisme. Nous avons pu mettre en évidence que ce clade ABCC est absent de certains organismes (ex. : fungi, nematodes, algues unicellulaires) suggérant que la présence même d'une seule copie de ce gène soit délétère pour ces organismes et que ce gène a été perdu à plusieurs reprise de façon indépendante au cours de l'évolution.

Afin, d'identifier des similitudes autres que phylogénétiques entre *CrABCC1* et *ABCC10*, nous nous sommes intéressés à la variété de transcrits produits par le gène *ABCC10*.

L'*ABCC10* humain se distingue des autres ABCC par l'existence de deux transcrits différents affectés dans la région 5' codant l'extension amino-terminale hydrophobe de la protéine (TMD0) (Kao *et al.* 2002, 2003). Nous avons étudié la séquence codant la région TMD0 de *CrABCC1* afin de déterminer si des transcrits différentiels affectaient l'organisation de la TMD0 également chez la plante. Nous avons pu mettre en évidence la présence d'un intron de type U12 dans cette région qui est conservé au sein des orthologues de *CrABCC1* chez les plantes supérieures. Cet intron qui n'existe pas dans le gène *ABCC10* et est partiellement épissé dans les transcrits *CrABCC1*. La rétention l'intron U12 mène à un changement de la séquence de l'*orf* de *CrABCC1* qui code alors pour une protéine prédite sans la 1^{ère} hélice α transmembranaire (TM1) du TMD0. Cette modification est tout à fait comparable aux protéines codées par les transcrits différentiels décrites dans les versions mammifères d'*ABCC10*. Bien que l'impact de cette modification sur la fonctionnalité du transporteur n'ait pas pu être déterminé, nous avons montré que ce processus modifie la localisation au tonoplaste du TMD0 chez *C. roseus*. La contribution du TMD0 à la spécificité aux substrats n'est pas totalement élucidée dans la littérature, mais l'implication de la partie TMD0 dans la localisation subcellulaire de plusieurs protéines ABCC humaines et de levure a été rapportée (Fernandez *et al.* 2002 ; Mason and Michaelis, 2002 ; Westlake *et al.* 2003 ; Westlake *et al.* 2005 ; Bandler *et al.* 2008). Il est difficile d'imaginer que les transporteurs

ABCC dépourvus de leur TM1 puissent être pleinement fonctionnels. En effet, la TM1 constitue le premier ancrage transmembranaire de la protéine qui oriente les sites de liaison à l'ATP coté cytosol des membranes biologiques ; une protéine à orientation « inversée » ne pourrait vraisemblablement pas être fonctionnelle. La fonction de cette modification reste encore à clarifier, notamment en caractérisant la présence des transcrits *in planta*, mais elle semble tenir une place importante dans la fonction des ABCC du clade III puisqu'elle a été maintenue au cours de l'évolution sur différents règnes.

A ce stade, l'élucidation de la fonction physiologique des MRP/ABCC du clade III reste complexe avec *C. roseus*. En effet, la plante dispose d'une croissance relativement lente, sa transformation génétique reste délicate et la régénération des plantes transformées est en cours de mise au point. Parce que nous avons pu établir que chez *Arabidopsis* le gène *AtABCC13* était l'orthologue unique de *CrABCC1*, l'étude du clade III s'est poursuivie sur cette plante modèle. La détermination expérimentale de l'organisation génomique de *CrABCC1*, nous a permis de proposer une nouvelle annotation de la région 5' du gène *AtABCC13*. Cette nouvelle annotation comprend une région codant pour l'extension TMD0 (alors non documentée), ainsi qu'un intron de type U12 en 2^{ème} position. L'existence de l'extension TMD0 ainsi que la rétention de l'intron U12 d'*AtABCC13* chez *Arabidopsis* a pu être aussi démontrée expérimentalement.

Dans la présente étude, nous avons caractérisé *AtABCC13* sur plan génétique et fonctionnel à partir des outils disponibles sur *Arabidopsis* : promoteur de transcription et lignées *knock-out*. Le promoteur de transcription a été fusionné au gène rapporteur GUS pour un suivi histochimique de son activité *in planta*. L'investigation du profil d'expression d'*AtABCC13* révèle une relation claire avec les différents tissus impliqués dans les échanges métaboliques (système vasculaire, jonction du filament sur l'anthère, funicule/région chalazale des graines). L'expression d'*AtABCC13* est aussi modulée par différentes hormones : positivement par l'acide gibbéréllique, négativement par la zéatine et l'acide abscissique. L'expression d'*AtABCC13* est également soumise à un contrôle nutritionnel complexe et les résultats ont montré que l'expression d'*AtABCC13* est modulée par l'approvisionnement en nutriments, notamment le phosphate et par l'effet de lumière. *AtABCC13* montre un profil d'expression original au sein de la sous-famille ABCC. Son expression semble être liée à la mise en place des vaisseaux conducteurs, notamment du phloème dans la tige, mais il n'est pas associé par la suite aux tissus conducteurs matures. Dans la plante, l'apport en nutriments et le développement des vaisseaux conducteurs sont

intimement liés ; le mode de régulation d'*AtABCC13* semble indiquer que ce gène soit impliqué dans des processus de développement de la plante liés à la circulation, l'assimilation ou au stockage des nutriments minéraux ou organiques.

La caractérisation fonctionnelle d'*AtBCC13* se poursuit avec l'établissement et l'étude de lignées mutantes *knock-out* pour *AtABCC13*. Les résultats préliminaires obtenus par cette approche ne montrent aucun phénotype particulier des mutants comparés aux plantes sauvages au niveau de développement de la plante sur un cycle de vie complet. En outre, les expériences d'allongement racinaires ou de germination en présence de divers traitements (phytohormones, composés toxiques, composés inducteurs de stress etc), n'ont pas permis de déceler de différences phénotypiques significatives. Il est possible que les déficiences amenées par la mutation d'*AtABCC13* soient compensées par des voies alternatives mis en place dans la plante mais qui pourraient être limitantes pour assurer le maintien de la plante en milieu naturel sur plusieurs générations.

Cependant, les expériences de dosage de phosphate qui ont été menées sur les KO *AtABCC13* ont montré des résultats prometteurs. En effet, la coloration histochimique du phosphate libre directement sur les plantes a mis en évidence un marquage plus prononcé au niveau des vaisseaux conducteurs des siliques des lignées *knock-out* comparé à la lignée sauvage, ce qui rappelle la coloration observée lors des analyses histochimiques GUS. Dans les graines mutantes aussi, nous avons mis en évidence une proportion de phosphate plus importante comparé aux graines sauvages. Ces résultats indiquent que *AtABCC13* est impliqué dans l'homéostasie du phosphate dans la plante, ou peut-être plus généralement, dans la gestion de certaines ressources minérales puisque son expression est aussi influencée par les nitrates.

A ce stade, il est difficile de définir la fonction physiologique d'*AtABCC13*, cependant l'ensemble des résultats obtenus ouvrent des champs d'investigations intéressants autour de la nutrition et du développement des plantes. La détermination des composés transportés par *AtABCC13* ou son homologue (*CrABCC1*) reste un point clef pour la détermination des fonctions physiologiques des transporteurs du clade III chez les plantes. L'étude du profil métabolique complet des mutants *AtABCC13* complétée par une caractérisation fonctionnelle du transporteur, par exemple par expression hétérologue en levure ou surexpression *in planta*, permettra de cerner d'avantage le cadre physiologique impliquant ces transporteurs ABC.

La caractérisation des capacités de transport de CrABCC1 vis-à-vis des vinca-alcaloïdes, permettrait de valider ou pas ce gène pour des programmes d'améliorations de plante pour la production de ces molécules. En effet, si le système d'introduction de gènes dans la plante entière reste délicat avec *C. roseus*, les transformations de lignées cellulaires maintenues en culture liquide restent réalisables. Plusieurs lignées cellulaires de *C. roseus* ont été caractérisées pour leur capacité de production de précurseurs des anticancéreux d'intérêt pharmacologique. Ces lignées pourraient être améliorées pour leur production d'alcaloïdes par l'expression de CrABCC1 qui augmenterait leur capacité de stockage vacuolaire ou alors, en détournant CrABCC1 du tonoplaste vers le plasmalemma, générerait des lignées sécrétrices d'alcaloïdes. Ce dernier système offre l'avantage de préserver la culture cellulaire pour collecter les molécules d'intérêt sans destruction du matériel végétal.

Enfin, la caractérisation fonctionnelle complète d'*AtABCC13*, ou son homologue du clade III *CrABCC1*, permettrait également de cerner la fonction physiologique d'ABCC10 chez l'homme. En effet, hormis ses capacités de transports d'anticancéreux, la fonction d'ABCC10 n'est pas été documentée à ce jour et aucune maladie génétique ne lui a été associée. On peut par exemple imaginer que des substrats physiologiques identifiés chez la plante puissent devenir des inhibiteurs, par compétition, d'ABCC10 lorsqu'il est impliqué dans la résistance tumorale aux traitements anticancéreux. D'un point de vue évolutif, il sera intéressant d'identifier les points communs entre les gènes de plantes et le gène humain, ainsi que les points de divergences.

Références bibliographiques

- Agarwal P.K, Jha B. 2010. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia Plantarum*. 54: 2201-212.
- Akabas M.H, Cheung M, Guinamard R. 1997. Probing the structural and functional domains of the CFTR chloride channel. *J Bioenerg Biomembr*. 29:453-463.
- Akabas M.H, Kaufmann C, Cook T.A, Archdeacon. 1994. Amino acid residues lining the chloride channel of the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*. 269: 14865-14868.
- Alam M.F, Safhi M.M, Chopra A.K, Dua V.K, 2011. Toxicological properties of several medicinal plants from the Himalayas (India) against vectors of malaria, filariasis and dengue. *Trop Biomed*. 28:343-50.
- Albrecht C, McVey J.H, Elliott J.I, Sardini A, Kasza I, et al. 2005. A novel missense mutation in ABCA1 results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. *Blood*. 106:542–549.
- Aleksandrov L, Aleksandrov A.A, Chang X.B, Riordan J.R. 2002. The first nucleotide binding domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a site of stable nucleotide interaction, whereas the second is a site of rapid turnover. *J Biol Chem*. 277: 15419-15425.
- Alioto T.S. 2007. U12DB: A database of orthologous U12-type spliceosomal introns. *Nucleic Acids Res*. 35, D110-115.
- Allen J.D, Brinkhuis R.F, Wijnholds J, Schinkel A.H. 1999. The mouse Bcrp1/Mxr/Abcgene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res*. 59:4237-4241.
- Allikmets R, Raskind W.H, Hutchinson A, Schueck N.D, Dean M, Koeller D.M. 1999. "Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A)." *Hum Mol Genet*.8: 743-749.
- Altschul S.F, Gish W, Miller W, Myers E.W, Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol*. 215: 403-410.
- Aronica E, Sisodiya S.M, Gorter J.A. 2012. Cerebral expression of drug transporters in epilepsy. *Adv Drug Deliv Rev*.64: 919-929.
- Arvy M.P, Imbault N, Naudascher F, Thiersault M, Doireau P. 1994. 2, 4-D and alkaloid accumulation in periwinkle cell suspensions. *Biochim*. 76: 410-416.
- Azpiroz-Leehan R, Feldmann KA. 1997. T-DNA insertion mutagenesis in Arabidopsis: going back and forth. *Trends Genet*. 13: 152-156.

- Azzaria M, Schurr E, Gros P. 1989. Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol Cell Biol.* 9: 5289-5297.
- Baba K, Karlberg A, Schmidt J, Schrader J, Hvidsten T.R, Bako L, Bhalerao R.P. 2011. Activity–dormancy transition in the cambial meristem involves stage-specific modulation of auxin response in hybrid aspen. *PNAS.*108: 3418-3423.
- Babenko A.P, Bryan J. 2003. Sur domains that associate with and gate KATP pores define a novel gatekeeper. *J. Biol. Chem.* 278: 41577-41580.
- Badone F.C, Cassani E, Landoni M, Doria E, Panzeri D, Lago C, Mesiti F, Nielsen E, Pili R. 2010. The low phytic acid1-241 (*lpa1-241*) maize mutation alters the accumulation of anthocyanin pigment in the kernel. *Planta.* 231: 1189-1199.
- Bairoch A. 1992. PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acids Res.* 20: 2013-2018.
- Bakos E, Evers R, Sinko E, Varadi A, Borst P and Sarkadi B.2000. Interactions of the human multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 with organic anions. *MolPharmacol.*57:760-768.
- Baluska F, Mancuso S, Volkmann D, Barlow P.W. 2010. Root apex transition zone: a signalling-response nexus in the root. *Trends Plant Sci.*15: 402-408.
- Bandler P.E, Westlake C.J, Grant C.E, Cole S.P, Deeley R.G. 2008. Identification of regions required for apical membrane localization of human multidrug resistance protein 2. *Mol Pharmacol.* 74:9-19.
- Barkla B.J, Vera-Estrella R, Pantoja O. 2014. Growing *Arabidopsis* in vitro: cell suspensions, in vitro culture, and regeneration. *Methods Mol Biol.*1062:53-62.
- Bartels A.L, Willemsen A.T, Kortekaas R, de Jong B.M, de Vries R, de Klerk O, van Oostrom J.C, Portman A, Leenders K.L. 2008. Decreased blood-brain barrier P-glycoprotein function in the progression of Parkinson’s disease, PSP and MSA. *J.Neural Transm.* 115:1001-1009.
- Barthe L, Ribet J.P, Péliou M, Degude M.J, Fahy J, Duflos A. 2002. Optimization of the separation of Vinca alkaloids by nonaqueous capillary electrophoresis. *J Chromatogr A.* 30: 241-250.
- Bastide F, Meissner G, Fleischer S, Post R.L. 1973. Similarity of the active site of phosphorylation of the adenosine triphosphatase for transport of sodium and potassium ions in kidney to that for transport of calcium ions in the Sarcoplasmic Reticulum of Muscle. *J Biol Chem.* 248:8385-8391.

- Baud S, Dubreucq B, Miquel M, Rochat C, Lepiniec L. 2008. Storage reserve accumulation in Arabidopsis: metabolic and developmental control of seed filling. *Arabidopsis Book*. 6: e0113.
- Bazzini S, Udine C, Sass A, Pasca M.R, Longo F, Emiliani G, Fondi M, Perrin E, Decorosi F, Viti C, Giovannetti L, Leoni L, Fani R, Riccardi G, Mahenthiralingam E, Buroni S. 2011. Deciphering the role of RND efflux transporters in Burkholderia cenocepacia. *PLoS One*. 6: e18902.
- Becker M.L, Visser L.E, van Schaik R.H, Hofman A, Uitterlinden A.G, Stricker B.H. 2009. Genetic variation in the multidrug and toxin extrusion 1 transporter protein influences the glucose-lowering effect of metformin in patients with diabetes: a preliminary study. *Diabetes*. 58:745-749.
- Benková E, Bielach A. 2010. Lateral root organogenesis - from cell to organ. - *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 677-683.
- Bergwitz C, Rasmussen M.D, DeRobertis C, Wee M.J, Sinha S, Chen H.H, Huang J, Perrimon N. 2012. Roles of major facilitator superfamily transporters in phosphate response in Drosophila. *PLoS One*. 7: e31730.
- Bessho Y, Oguri T, Ozasa H, Uemura T, Sakamoto H, Miyazaki M, Maeno K, Sato S, Ueda R. 2009. ABC10/MRP7 is associated with vinorelbine resistance in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 21:263-268.
- Beyenbach K.W. 1990. Transport of magnesium across biological membranes. *Magnesium Trace Elem.* 9:233-254.
- Bienengraeber M, Alekseev A.E, Abraham M.R, Carrasco A.J, Moreau C, Vivaudou M, Dzeja P.P, Terzic A. 2000. ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the KATP channel complex. *FASEB J*. 14:1943-1952.
- Bishopp A, Lehesranta S, Vatén A, Help H, El-Showk S, Scheres B, Helariutta K, Mähönen A.P, Sakakibara H, Helariutta Y. 2011. Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem. *Curr Biol*. 21: 927-932.
- Blakeslee J.J, Bandyopadhyay A, Lee O.R, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, Makam S.N, Cheng Y, Bouchard R, Adamec J, Geisler M, Nagashima A, Sakai T, Martinoia E, Friml J, Peer W.A, Murphy A.S. 2007. Interactions among PIN-FORMED and P-Glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell*. 19:131-147.
- Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. 2004. Prediction of post translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*. 4: 1633-1649.
- Bolhuis H, van Veen HW, Poolman B, Driessen AJ, Konings WN. 1997. Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiol Rev*. 21:55-84.

- Bovet L, Eggmann T, Meylan-Bettex M, Polier J, Kammer P, Marin E, Feller U, Martinoia E. 2003. Transcript levels of MRPs: induction of AtMRP3 after cadmium treatments. *Plant Cell Environ.* 26: 371-381.
- Brockman J.M, Singh P, Liu D, Quinlan S, Salisbury J, Graber J.H. 2005. PACdb: PolyA Cleavage Site and 3'-UTR Database. *Bioinformatics.* 21:3691-3693.
- Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee S.M, Zhang L.H, Roomp K, van Dam M.J, Yu L, et al. 1999. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet.* 22: 336-345.
- Bun-ya M, Nishimura M, Harashima S, Oshima Y. 1991. The Pho84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol Cell Biol.* 11: 3229-3238.
- Burlat V, Oudin A, Courtois M, Rideau M, St-Pierre B. 2004. Co-expression of three MEP pathway genes and geraniol 10 hydroxylase in internal phloem parenchyma of *Catharanthus roseus* implicates multicellular translocation of intermediates during biosynthesis of monoterpene indole alkaloids and isoprenoid-derived primary metabolites. *Plant J.* 38: 131-141.
- Campion B, Sparvoli F, Doria E, Tagliabue G, Galasso I, Fileppi M, Bollini R, Nielsen E. 2009. Isolation and characterisation of an lpa (low phytic acid) mutant in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor Appl Genet.* 118:1211-21.
- Canivenc G. 2005. Implication des gènes PTR d'*Arabidopsis thaliana* dans le transport de nitrate. Thèse, Université de Montpellier II.
- Casado Pedro, Pedro Zuazua-Villar, Eva del Valle, Carlos Martínez-Campa, Pedro S. Lazo, Sofía Ramos. 2007. Vincristine regulates the phosphorylation of the antiapoptotic protein HSP27 in breast cancer cells. *Cancer Letters.* 247: 273-282.
- Chan K.W, Zhang H, Logothetis D.E. 2003. N-terminal transmembrane domain of the SUR controls trafficking and gating of Kir6 channel subunits. *EMBO J.* 22: 3833-3843.
- Chang G, Roth C.B. 2001. Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science.* 293: 1793-1800.
- Chen Y.J, Pornillos O, Lieu S, Ma C, Chen A.P, Chang G. 2007. X-ray structure of EmrE supports dual topology model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104:18999-19004.
- Chen Z. S, Hopper-Borge E, Belinsky M.G, Shchaveleva I, Kotova E, Kruh G.D. 2003. Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10). *Mol. Pharmacol.* 63: 351-358.

- Cho M, Lee S.H, Cho H.T. 2007. P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in Arabidopsis root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell*. 19: 3930-3943.
- Cho M, Lee Z.W, Cho H.T. 2012. ATP-Binding Cassette B4, An Auxin-Efflux Transporter, Stably Associates with the Plasma membrane and shows distinctive intracellular trafficking from that of PIN-FORMED proteins. *Plant Physiology*. 159: 642-654.
- Choi H, Jin J.Y, Choi S, Hwang J.U, Kim Y.Y, Suh M.C, Lee Y. 2011. An ABCG/WBC-type ABC transporter is essential for transport of sporopollenin precursors for exine formation in developing pollen. *Plant J*. 65:181-193.
- Clough S.J, Bent A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 16: 735-743.
- Cock J.M, Sterck L, Rouze P, Scornet D, Allen A.E, Amoutzias G, Anthouard V, Artiguenave F, Aury J.M, Badger J.H. 2010. The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature*. 465:617-621.
- Cohen T. S, Prince A. 2012. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med*. 18: 509-519.
- Cole S.P, Bhardwaj G, Gerlach J.H, Mackie J.E, Grant C.E, Almquist K.C, Stewart A.J, KurzE.U, Duncan A.M, Deeley R.G. 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 258:1650-1654.
- Conant G.C, Wagner A. 2004. Duplicate genes and robustness to transient gene knock-downs in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Biol Sci*. 271:89-96.
- Costa M.M, Hilliou F, Duarte P, Pereira L.G, Almeida I, Leech M, Memelink J, Barceló A.R, Sottomayor M. 2008. Molecular cloning and characterization of a vacuolar class III peroxidase involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol*. 146 : 403-417.
- Courdavault V, Burlat V, St-Pierre B, Giglioli-Guivarc'h N, 2005. Characterisation of CaaXprenyltransferases in *Catharanthus roseus*: relationships with the expression of genes involved in the early stages of monoterpenoid biosynthetic pathway. *Plant Sci*. 168: 1097-1107.
- Courdavault V, Burlat V, St-Pierre B, Giglioli-Guivarc'h N. 2005. Characterisation of CaaXprenyltransferases in *Catharanthus roseus*: relationships with the expression of genes involved in the early stages of monoterpenoid biosynthetic pathway. *Plant Sci*. 168:1097-1107.
- Davidson A.L, Chen J. 2004. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Rev. Biochem*. 73:241-268.

- Dawson J.E, Farber P.J, Forman-Kay J.D. 2013. Allosteric coupling between the intracellular coupling helix 4 and regulatory sites of the first nucleotide-binding domain of CFTR. *PLoS One*. 8:e74347.
- De Carolis E, De Luca V. 1993. Purification, characterization, and kinetic analysis of a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase involved in vindoline biosynthesis from *Catharanthus roseus*. *J Biol Chem*. 268: 5504-5511.
- De Luca V, Marineau C, Brisson N. 1989. Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: comparison with animal dopa decarboxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 86: 2582-2586.
- De Smet I, Zhang H, Inzé D, Beeckman T. 2006. A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends Plant Sci*. 11: 434-439.
- De Smet I, Tetsumura T, De Rybel B, Frey NF, Laplaze L, Casimiro I, Swarup R, Naudts M, Vanneste S, Audenaert D, Inzé D, Bennett M.J, Beeckman T. 2007. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development*. 134: 681-690.
- De Waal A, Meijer A.H, Verpoorte R. 1995. Strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*: purification and characterization of multiple forms. *Biochem. J*. 306: 571-580.
- Dean M, Annilo T. 2005. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 6:123-142.
- Dean M, Rzhetsky A and Allikmets R. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*. 11:1156-1166.
- Dean M. 2002. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
- Dean M. 2005. The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods Enzymol*. 400: 409-429.
- Dean M, Allikmets R. 1995. Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev*. 5:779-785.
- Dean M. 2009. ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 14:3-9.
- Decottignies A, Goffeau A. 1997. Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet*. 15: 137-145
- Deeley R.G, Cole S.P. 1997. Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). *Semin Cancer Biol*. 8:193-204.

- Deeley, R.G, and Cole, S.P. 2003. Multidrug resistance protein 1 (ABCC1). New York: Elsevier Science, 393-422.
- Demirel O, Bangert I, Tampé R, Abele R. 2010. Tuning the cellular trafficking of the lysosomal peptide transporter TAPL by its N-terminal domain. *Traffic*. 11:383-393.
- Devidas S, Guggino W. B. 1997. CFTR: Domains, Structure, and Function. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* . 29:443-451.
- Diederichs K, Diez J, Greller G, Muller C, Breed J, Schnell C, Vonrhein C, Boos W, Welte W. 2000. Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*. *EMBO J*. 19:5951-5961.
- Dixon R.A, Gonzales R.A. 1994. Plant cell culture: a practical approach. Oxford University Press. 230 p.
- Donehower R.C, Rowinsky E.K, Devita V.T, Hellman S, Rosenberg S.A, 1993. Cancer Principles and Practice of Oncology. J.P. Lippincott, Philadelphia. p: 409.
- Dooner H.K, Robbins T.P, Jorgensen R.A. 1991. Genetic and Developmental Control of anthocyanin biosynthesis. *Annu Rev Genet*. 25:173-199.
- Doshi R, van Veen H.W. 2013. Substrate binding stabilizes a pre-translocation intermediate in the ATP-binding cassette transport protein MsbA. *J Biol Chem*. 288:21638-2147.
- Doughty D.M, Coleman M.L, Hunter R.C, Sessions A.L, Summons R.E, Newman D.K. 2011. The RND-family transporter, HpnN, is required for hopanoid localization to the outer membrane of *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 108: E1045-1051.
- Doyle L.A, Yang W, Abruzzo L.V, Krogmann T, Gao Y, Rishi A.K and Ross D.D. 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 95:15665-15670.
- Ducos E, Frayssé S, Boutry M. 2005. NtPDR3, an iron-deficiency inducible ABC transporter in *Nicotiana tabacum*. *FEBS Lett*. 579: 6791-6795.
- Duffin J. 2000. Poisoning the spindle: serendipity and discovery of the anti-tumor properties of the Vinca alkaloids. *Can Bull Med Hist*. 17: 155-192.
- Duffin J. 2002a. Poisoning the spindle: serendipity and discovery of the anti-tumor properties of the Vinca alkaloids. *Pharm Hist*. 44: 64-76.
- Duffin J. 2002b. Poisoning the spindle: serendipity and discovery of the anti-tumor properties of the Vinca alkaloids (Part II). *Pharm Hist*. 44: 105-119.

- Durrett T.P, Gassmann W, Rogers E.E. 2007. The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiology* .144:197-205.
- Eckford P.D, Sharom F.J. 2010. The reconstituted *Escherichia coli* MsbA protein displays lipid flippase activity. *Biochem J*. 429:195-203.
- Egbelakin A, Ferguson M.J, MacGill E.A, Lehmann A.S, Topletz A.R, Quinney S.K, Li L, McCammack K.C, Hall S.D, Renbarger J.L. 2012. Increased Risk of Vincristine Neurotoxicity Associated with Low CYP3A5 Expression Genotype in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Blood Cancer*.56(3):361-7.
- Ehrle R, Pick C, Ulrich R, Hofmann E, Ehrmann M. 1996. Characterization of transmembrane domains 6, 7 and 8 of MalF by mutational analysis. *J Bacteriol*. 178: 2255-2262.
- Elo A, Immanen J, Nieminen K, Helariutta Y. 2009. Stem cell functions during plant vascular development. *Semin. Cell Dev. Biol*. 20:1097-1106.
- Ewart G.D, Cannell D, Cox G.B, Howells A.J. 1994. Mutational analysis of the traffic ATPase (ABC) transporters involved in uptake of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. Implications for structure-function relationships. *J. Biol. Chem*. 269: 10370-10377.
- Facchini P.J, De Luca V. 2008. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *Plant J*. 54:763-784.
- Facchini P.J. 2001. Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Biology*. 52: 29-66.
- Fang K, Csanády L, Chan K.W. 2006. The N-terminal transmembrane domain (TMD0) and a cytosolic linker (L0) of sulphonylurea receptor define the unique intrinsic gating of KATP channels. *J Physiol*. 576:379-389.
- Fernandez S.B, Hollo Z, Kern A, Bakos E, Fischer P.A, Borst P, Evers R. 2002. Role of the N-terminal transmembrane region of the multidrug resistance protein MRP2 in routing to the apical membrane in MDCKII cells. *J Biol Chem*. 277: 31048-31055.
- Fernandez S.B, Hollo Z, Kern A, Bakos E, Fischer P.A, Borst P, Evers R. 2002. Role of the N-terminal transmembrane region of the multidrug resistance protein MRP2 in routing to the apical membrane in MDCKII cells. *J. Biol. Chem*. 277: 31048-31055.
- Fernández-Pérez F, Almagro L, Pedreño MA, Gómez Ros LV., 2013. Synergistic and cytotoxic action of indole alkaloids produced from elicited cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Pharm Biol*. 51: 304-310.
- Ferro M, Brugiere S, Salvi D, Seigneurin-Berny D. 2010. AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol. Cell. Proteomics*. 9:1063-1084.

- Filippini R, Caniato R, Piovan A, Cappelletti EM. 2003. Production of anthocyanins by *Catharanthus roseus*. *Fitoterapia*. 74: 62-67.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C. 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 387-41.
- Flens M.J, Zaman G.J, van der Valk P, Izquierdo M.A, Schroeijers A.B, Scheffer G.L, van derGroep P, de Haas M, Meijer C.J and Scheper R.J. 1996. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol.* 148:1237-1247.
- Forrest L.R, Krämer R, Ziegler C. 2011. The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1807: 167-188.
- Frelet A, Klein M. 2006. Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis. *FEBS Lett.* 580:1064-1084.
- Frelet-Barrand A, Kolukisaoglu H.U, Plaza S, Rüffer M, Azevedo L, Hörtensteiner S, Marinova K, Weder B, Schulz B, Klein M. 2008. Comparative mutant analysis of Arabidopsis ABCC-type ABC transporters: AtMRP2 contributes to detoxification, vacuolar organic anion transport and chlorophyll degradation. *Plant Cell Physiol.* 49:557-569.
- Gadsby D.C, Nairn A.C. 1999. Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev.*79: S77-S107.
- Gaillard S, Jacquet H, Vavasseur A, Leonhardt N, Forestier C. 2008. AtMRP6/AtABCC6, an ATP-binding cassette transporter gene expressed during early steps of seedling development and up-regulated by cadmium in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 28:8-22.
- Gamborg O.L, Miller R.A, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res.* 50:151-158.
- Gao M, Yamazaki M, Loe D.W, Westlake C.J, Grant C.E, Cole S.P, and Deeley R.G. 1998. Multidrug resistance protein. Identification of regions required for active transport of leukotriene C4. *J. Biol. Chem.* 273:10733-10740.
- Garcia O, Bouige P, Forestier C, Dassa E. 2004. Inventory and comparative analysis of rice and Arabidopsis ATP-binding cassette (ABC) systems. *J Mol Biol.* 343:249-265.
- Garrigues A, Loiseau N, Delaforge M, Ferte J, Garrigos M, Andre F, Orlowski S. 2002. Characterization of two pharmacophores on the multidrug transporter P-glycoprotein. *Mol Pharmacol.* 62:1288-1298.
- Gaudet R, Wiley D.C. 2001. Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *EMBO J.* 20: 4964-4972.

- Geerlings A, Ibanez M.M, Memelink J, Van Der Heijden R, Verpoorte R. 2000. Molecular cloning and analysis of strictosidine beta-D-glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *J Biol Chem*. 275: 3051-3056.
- Geisler M, Blakeslee J.J, Bouchard R, Lee O.R, Vincenzetti V, Bandyopadhyay A, Titapiwatanakun B, Peer W.A, Bailly A, Richards E.L, Ejendal K.F, Smith A.P, Baroux C, Grossniklaus U, Muller A, Hrycyna C.A, Dudler R, Murphy A.S, Martinoia E. 2005. Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J*. 44:179-194.
- Geisler M, Girin M, Brandt S, Vincenzetti V, Plaza S, Paris N, Kobae Y, Maeshima M, Billion K, Kolukisaoglu U.H, Schulz B, Martinoia E. 2004. Arabidopsis immunophilin-like TWD1 functionally interacts with vacuolar ABC transporters. *Mol. Biol. Cell*. 15: 3393-3405.
- Gill D.R, Hyde S.C, Higgins C.F, Valverde M.A, Mintenig G.M, Sepulveda F.V. 1992. Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Cell*. 71:23-32.
- Githens T.S. 1949. *Drug Plant of Africa*. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1949.
- Giuliani S.E, Frank A.M, Corgliano D.M, Seifert C, Hauser L, Collart F.R. 2011. Environment sensing and response mediated by ABC transporters. *BMC Genomics*. 12 :S8
- Goodman C.D, Casati P, Walbot V. 2004. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *The Plant Cell*. 16: 1812-1826.
- Goto H, Kariya R, Shimamoto M, Kudo E, Taura M, Katano H, Okada S. 2012. Antitumor effect of berberine against primary effusion lymphoma via inhibition of NF- κ B pathway. *Cancer Sci*. 103:775-781.
- Gottesman M.M, Ambudkar S.V. 2001. Overview: ABC transporters and human disease. *J Bioenerg Biomembr*. 33: 453-458.
- Gottesman M.M, Pastan I. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*. 62:385-427.
- Gottesman M.M. 2002. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med*. 53:615-627.
- Grec S, Vanham D, de Ribaucourt J.C, Purnelle B, Boutry M. 2003. Identification of regulatory sequence elements within the transcription promoter region of NpABC1, a gene encoding a plant ABC transporter induced by diterpenes. *Plant J*. 35: 237-250.
- Green L.S, Rogers E.E. 2004. FRD3 controls iron localization in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 136:2523-2531.

- Gröger J. 1985. Alkaloids derived from tryptophan. *Biochemistry of alkaloids*. 272-374.
- Gu Z, Steinmetz L.M, Gu X, Scharfe C, Davis R.W, Li W.H. 2003. Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature*. 421:63-66.
- Guangyu W. 2010. State-dependent Regulation of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gating by a High Affinity Fe³⁺ Bridge between the Regulatory Domain and Cytoplasmic Loop 3. *Biol Chem*. 285: 40438-40447.
- Guindon S, Delsuc F, Dufayard J.F, Gascuel O. 2009. Estimating maximum likelihood phylogenies with phyML. *Methods in Molecular Biology*. 537: 113-137.
- Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*. 52: 696-704.
- Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O. 2005. PhyML Online a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research*. 33: W557-559.
- Guirimand G, Burlat V, Oudin A, Lanoue A, St-Pierre B, Courdavault V. 2009. Optimization of the transient transformation of *Catharanthus roseus* cells by particle bombardment and its application to the subcellular localization of hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate synthase and geraniol 10-hydroxylase. *Plant Cell Rep*. 28: 1215-1234.
- Guirimand G, Courdavault V, Lanoue A, Mahroug S, Guihur A, Blanc N, Giglioli-Guivarc'h N, St-Pierre B, Burlat V. 2010b. Strictosidine activation in Apocynaceae: to-wards a "nuclear time bomb"? *BMC Plant Biol*. 10: 182.
- Guirimand G, Courdavault V, St-Pierre B, Burlat V. 2010a. Biosynthesis and regulation of alkaloids. *Plant developmental biology-biotechnological perspectives*. pp139-160.
- Guo Y, Kotova E, Chen Z.S, Lee K, Hopper-Borge E, Belinsky M.G, Kruh G.D. 2003. MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2', 3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl) adenine. *J Biol Chem*. 278: 29509-29514.
- Hall S.L, Padgett R.A, 1994. Conserved sequences in a class of rare eukaryotic nuclear introns with non-consensus splice sites. *J. Mol. Biol*. 239: 357-365.
- Hallard D. 2000. Transgenic plant cells for the production of indole alkaloids. Thèse de l'université de Leiden, Pays-Bas, 130 pages.
- Hanada K, Kuromori T, Myouga F, Toyoda T, Li W-H, Shinozaki K. 2009. Evolutionary Persistence of Functional Compensation by Duplicate Genes in *Arabidopsis*. *Genome Biol*. 1: 409-414.

- Hanikenne M, Krämer U, Demoulin V, Baurain D. 2005. A comparative inventory of metal transporters in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and the red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Plant Physiol.* 137: 428-446.
- Hassan M, Osman M.M. 2010. Combination of oral vinorelbine and capecitabine in the treatment of metastatic breast cancer patients previously exposed to anthracyclines: a pilot study. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 3:185-190.
- Hayashi M, Nito K, Takei-Hoshi R, Yagi M, Kondo M, Suenaga A, Yamaya T, Nishimura M. 2002. Ped3p is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter that might supply substrate for fatty acid β -oxidation. *Plant Cell Physiol.* 43:1-11.
- He G.X, Thorpe C, Walsh D, Crow R, Chen H, Kumar S, Varela M.F. 2011. EmmdR, a new member of the MATE family of multidrug transporters, extrudes quinolones from *Enterobacter cloacae*. *Arch Microbiol.* 193:759-765.
- He L, Aleksandrov A.A, Serohijos A.W, Hegedus T, Aleksandrov L.A, Cui L, Dokholyan N.V, Riordan J.R. 2008. Multiple membrane-cytoplasmic domain contacts in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mediate regulation of channel gating. *J Biol Chem.* 283:26383-26390.
- He P, Shan L, Sheen J. 2007. The use of protoplasts to study innate immune responses. *Methods Mol. Biol.* 354: 1-9.
- He X, Szewczyk P, Karyakin A, Evin M, Hong W.X, Zhang Q, Chang G. 2010. Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. *Nature.* 467:991-994.
- Hedrich R, Kurkdjian A, Guern J, Flugge U.I. 1989. Comparative Studies on the Electrical-Properties of the H⁺ Translocating Atpase and Pyrophosphatase of the Vacuolar-Lysosomal Compartment. *Journal of the European Molecular Biology Organization.* 8: 2835-2841.
- Higgins C.F, Linton K.J. 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:918-926.
- Higgins C.F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8: 67-113.
- Higgins C.F. 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism-an overview. *Res. Microbiol.* 152: 205-210.
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T. 1999. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acid Res.* 27: 297-300.

- Hilliou F, Costa M, Almeida I, Lopes Cardoso I, Leech M, Ros Barceló A, Sottomayor M. 2002. Cloning of a peroxidase enzyme involved in the biosynthesis of pharmaceutically active terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *IBMC*. 823:4150-4180.
- Hipfner D.R, Almquist K.C, Leslie E.M, Gerlach J.H, Grant C.E, Deeley R.G, Cole S.P.C. 1997. Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytoplasmic NH₂-terminus. *J. Biol. Chem.* 272: 23623-23630.
- Hirner B, Fischer W.N, Rentsch D, Kwart M, Frommer W.B. 1998. Developmental control of H⁺/amino acid permease gene expression during seed development of *Arabidopsis*. *Plant J.* 14: 535-544.
- Hitz W.D, Carlson T.J, Kerr P.S, Sebastian S.A. 2002. Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds. *Plant Physiol.* 128:650-660.
- Holland I.B, Cole S.P.C, Kuchler K, Higgins C.F. 2002. *ABC Proteins: From Bacteria to Man*. ISBN 0-12- 352551-9.
- Holland I.B, Blight M.A, 1999. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J. Mol. Biol.* 293: 381-399.
- Hollenstein K, Dawson R.J, Locher K.P. 2007. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17:412-418.
- Hollenstein K, Frei D.C, Locher K.P. 2007. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature*. 446:213-216.
- Hopfner K.P, Karcher A, Shin D.S, Craig L, Arthur L.M, Carney J.P and Tainer J.A 2000. Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell*. 101:789-800.
- Hopper-Borge E, Xu X, Shen T, Shi Z, Chen Z.S, Kruh, G.D. 2009. Human multidrug resistance protein 7 (ABCC10) is a resistance factor for nucleoside analogues and epothilone B. *Cancer Res.* 69:178-184.
- Hopper-Borge E, Chen Z.S, Shchaveleva I, Belinsky M.G, Kruh G.D. 2004. Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer Res.* 64: 4927-4930.
- Hopper-Borge E.A, Churchill T, Paulose C, Nicolas E, Jacobs J.D, Ngo O, Kuang Y, Grinberg A, Westphal H, Chen Z-S, et al. 2011. Contribution of Abcc10 (Mrp7) to In Vivo Paclitaxel Resistance as Assessed in Abcc10^{-/-} Mice. *Cancer Res.* 71: 3649-3657.

- Hrycyna C.A, Ramachandra M, Germann U.A, Cheng P.W, Pastan I and Gottesman MM. 1999. Both ATP sites of human P-glycoprotein are essential but not symmetric. *Biochemistry*. 38:13887-13899.
- Huelsenbeck J.P, Crandall K.A. 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28: 437-466.
- Hung L.W, Wang I.X, Nikaido K, Liu P.Q, Ames G.F and Kim S.H. 1998. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature*. 396:703-707.
-
- Hunke S, Mourez M, Jehanno M, Dassa E, Schneider E. 2000. ATP modulates subunit-subunit interactions in an ATP-binding cassette transporter (MalFGK2) determined by site-directed chemical cross-linking. *J Biol Chem*. 275:15526-15534.
- Hvorup R.N, Goetz B.A, Niederer M, Hollenstein K, Perozo E, Locher K.P. 2007. Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF. *Science*. 317:1387-1390.
- Hvorup R.N, Winnen B, Chang A.B, Jiang Y, Zhou X, Saier MH. 2003. The multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide (MOP) exporter superfamily. *European Journal of Biochemistry*. 270:799-813.
- Hwang C.F, Lin Y, D'Souza T, Cheng C.L. 1997. Sequences necessary for nitrate-dependent transcription of *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiol*. 113: 853-862.
- Hyde S.C, Emsley P, Hartshorn M.J, Mimmack M.M, Gileadi U, Pearce S.R, Gallagher M.P, Gill D.R, Hubbard R.E, Higgins C.F. 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*. 346: 362-365.
- Iino R, Nishino K, Noji H, Yamaguchi A, Matsumoto Y. 2012. A microfluidic device for simple and rapid evaluation of multidrug efflux pump inhibitors. *Front Microbiol*. 3:40.
- Inagaki N, Gono T, Clement J.P, Wang C.Z, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S. 1996. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron*. 16:1011-1017.
- Irmeler S, Schroder G, St-Pierre B, Crouch N.P, Hotze M, Schmidt J, Strack D, Matern U, Schröder J. 2000. Indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*: new enzyme activities and identification of cytochrome P450 CYP72A1 as secologanin synthase. *Plant J*. 24: 797-804.
- Israelsson M, Sundberg B, Moritz T. 2005. Tissue-specific localization of gibberellins and expression of gibberellin-biosynthetic and signalling genes in wood forming tissues in aspen. *Plant J*. 44: 494-504.

- Jacquemin E. 2000. Progressive familial intrahepatic cholestasis. Genetic basis and treatment. Clin Liver Dis. 4:753-763.
- Jaleel C.A, Gopi R, Manivannan P, Gomathinayagam M, Sridharan R, Panneerselvam R. 2008. Antioxidant potential and indole alkaloid profile variations with water deficits along different parts of two varieties of *Catharanthus roseus*. Colloids Surf B Biointerfaces. 62: 312-318.
- Janas E, Hofacker M, Chen M, Gompf S, van der Does C, Tampe R. 2003. The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1p. J. Biol. Chem. 278: 26862-26869.
- Jaquinod M, Villiers F, Kieffer-Jaquinod S, Hugouvieux V, Bruley C, Garin J, Bourguignon J. 2007. A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. Mol. Cell. Proteomics. 6:394-412.
- Jasinski M, Stukkens Y, Degand H, Purnelle B, Marchand-Brynaert J, Boutry M. 2001. A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. Plant Cell. 13: 1095-1107.
- Jasinski M, Ducos E, Martinoia E, Boutry M. 2003. The ATP-binding cassette transporters: structure, function and gene family comparison between rice and *Arabidopsis*. Plant Physiol. 131:1169-1177.
- Jasiński M, Stukkens Y, Degand H, Purnelle B, Marchand-Brynaert J, Boutry M. 2001. A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. Plant Cell. 13:1095-1107.
- Jefferson R.A. 1989. The GUS reporter gene system. Nature. 342: 837-838.
- Jones P.M, George A.M. 2004. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. Cell Mol Life Sci. 61: 682-699.
- Jones P.M, George A.M. 2009. Opening of the ADP-bound active site in the ABC transporter ATPase dimer: evidence for a constant contact, alternating sites model for the catalytic cycle. Proteins. 75:387-396.
- Jonker J.W, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk M.A, Scheffer G.L, Scheper R.J, Plosch T, Kuipers F, Elferink R.P, Rosing H, Beijnen J.H, Schinkel A.H. 2002. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99:15649-15654.
- Joseph B, Jeschke G, Goetz B.A, Locher K.P, Bordignon E. 2011. Transmembrane gate movements in the type II ATP-binding cassette (ABC) importer BtuCD-F during nucleotide cycle. J Biol Chem. 286: 41008-41017.
- Kang J, Hwang J.U, Lee M, Kim Y.Y, Assmann S.M, Martinoia E, Lee Y. 2010. PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107: 2355-2360.

- Kang J, Park J, Choi H, Burla B, Kretzschmar T, Lee Y, Martinoia E. 2011. Plant ABC Transporters. *Arabidopsis Book* 9, e 0153.
- Kang J, Hwang J.U, Lee M, Kim Y.Y, Assmann S.M, Martinoia E, Lee Y. 2010. PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:2355-2360.
- Kao H.H, Chang M.S, Cheng J.F, Huang J.D. 2003. Genomic structure, gene expression, and promoter analysis of human multidrug resistance-associated protein 7. *J. Biomed. Sci.* 10: 98-110.
- Kao H.H, Huang J.D, Chang M.S. 2002. cDNA cloning and genomic organization of the murine MRP7, a new ATP-binding cassette transporter. *Gene.* 286: 299-306.
- Karpowich N, Martsinkevich O, Millen L, Yuan Y.R, Dai P.L, MacVey K, Thomas P.J and Hunt J.F. 2001. Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure.* 9:571-586.
- Kay Christopher, Woodward K.D, Lawler K, Self T.J, Dyll S.D, Kerr I.D. 2012. The ATP-binding cassette proteins of the deep-branching protozoan parasite *trichomonas vaginalis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 6: e1693.
- Kerr I.D. 2002. Structure and association of ATP-binding cassette transporter nucleotide binding domains. *Biochim Biophys Acta.* 1561:47-64.
- Kidd J.F, Ramjeesingh M, Stratford F, Huan L.J, Bear C.E. 2004. A heteromeric complex of the two nucleotide binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mediates ATPase activity. *J Biol Chem.* 279: 41664-41669.
- King G, Sharom F.J. 2012. Proteins that bind and move lipids: MsbA and NPC1. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 47:75-95.
- King N, et al. 2008. The genome of the choanoflagellate *Monosiga brevicollis* and the origin of metazoans. *Nature.* 451: 783-788.
- Klein M, Burla B, Martinoia E. 2006. The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *FEBS Lett.* 580:1112-1122.
- Klein M, Geisler M, Suh S.J, Kolukisaoglu H.U, Azevedo L, Plaza S, Curtis M.D, Richter A, Weder B, Schulz B, Martinoia E. 2004. Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABCC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. *Plant J.* 39:219-36.

- Klein M, Perfus-Barbeoch L, Frelet A, Gaedeke N, Reinhardt D, Mueller-Roeber B, Martinoia E, Forestier C. 2003. The plant multidrug resistance ABC transporter AtMRP5 is involved in guard cell hormonal signalling and water use. *Plant J.* 33:119-129.
- Kolukisaoglu, H.U., Bovet, L., Klein, M., Eggmann, T., Geisler, M., Wanke, D., et al., 2002. Family business: the multidrug-resistance related protein (MRP) ABC transporter genes in *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 216: 107-119.
- Kooij G, van Horsen J, Bandaru V.V, Haughey N.J, de Vries H.E. 2012. The Role of ATP-Binding Cassette Transporters in Neuro-Inflammation: Relevance for Bioactive Lipids. *Front Pharmacol.* 3:74.
- Kovalchuk A, Driessen A.J.M. 2010. Phylogenetic analysis of fungal ABC transporters. *BMC Genomics.* 11:177-197.
- Kreimer D.I, Chai K.P, Ames G.F.L. 2000. Nonequivalence of the nucleotide-binding subunits of an ABC transporter, the histidine permease, and conformational changes in the membrane complex. *Biochemistry.* 39:14183-14195.
- Kretschmar T, Kohlen W, Sasse J, Borghi L, Schlegel M, Bachelier J.B, Reinhardt D, Bours R, Bouwmeester H.J, Martinoia E. 2012. A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature.* 483:341-344.
- Krishnamurthy P, Schuetz J. D. 2006. Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46: 381-410.
- Bilyeu K.D, Zeng P, Coello P, Zhang Z.J, Krishnan H.B, Bailey A, Beuselinck P.R, Polacco J.C. 2008. Quantitative Conversion of Phytate to Inorganic Phosphorus in Soybean Seeds Expressing a Bacterial Phytase. *Plant Physiol.* 146: 468-477.
- Kruh G.D, Guo Y, Hopper-Borge E, Belinsky M.G, Chen Z.S, 2007. ABCC10, ABCC11, and ABCC12. *Pflugers Arch.* 453: 675-684.
- Kuang Y.H, Shen T, Chen X, Sodani K, Hopper-Borge E, Tiwari A.K, Lee J.W, Fu L.W, Chen Z.S. 2010. Lapatinib and erlotinib are potent reversal agents for MRP7 (ABCC10)-mediated multidrug resistance. *Biochem Pharmacol.* 79:154-161.
- Kumar A, Schweizer H.P. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev.* 57: 1486-1513.
- Kuromori T, Miyaji T, Yabuuchi H, Shimizu H, Sugimoto E, Kamiya A, Moriyama Y, Shinozaki K. 2010. ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 2361-2366.
- Kutchan, T.M. 2005. A role for intra- and intercellular translocation in natural product biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 292-300.

- Laflamme P, St-Pierre B, De Luca V. 2001. Molecular and biochemical analysis of a Madagascar periwinkle root-specific minovincinine-19-hydroxy-O-acetyltransferase. *Plant Physiol.* 125: 189-198.
- Lage H. 2003. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *International journal of antimicrobial agents.* 22:188-199.
- Iyer L.M, Leippe D.D, Koonin E.V, Aravind L. 2004. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. . *J Struct Biol.* 146:11-31.
- Lange B.M, Ghassemian M. 2003. Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Mol Biol.* 51: 925-948.
- Langford D, Grigorian A, Hurford R, Adame A, Ellis R.J, Hansen L, Masliah E. 2004. Altered P-glycoprotein expression in AIDS patients with HIV encephalitis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63:1038-1047.
- Langmann T, Mauere R, Zahn A, Moehle C, Probst M, Stremmel W and Schmitz G. 2003. Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATPbinding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin Chem.* 49:230-238.
- Laplace L, Benkova E, Casimiro I, Maes L, Vanneste S, Swarup R, Weijers D, Calvo, V, Parizot B, Herrera-Rodriguez M.B, Offringa R, Graham N, Doumas P, Friml J, Bogusz D, Beeckman T, Bennett M. 2007. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell:* 3889-3900.
- Laux T, Würschum T, Breuninger H. 2004. Genetic regulation of embryonic pattern formation. *Plant Cell.* 16: S190-S202.
- Law C.J, Maloney P.C, Wang D.N. 2008. Review Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. *Annu Rev Microbiol.* 62:289-305.
- Lee C, Raffaghello L, Longo V.D. 2012. Starvation, detoxification, and multidrug resistance in cancer therapy. *Drug Resist Updat.* 15:114-122.
- Lee M, Choi Y, Burla B, Kim Y.Y, Jeon B, Maeshima M, Yoo J.Y, Martinoia E, Lee Y. 2008. The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂. *Nat. Cell Biol.* 10:1217–1223.
- Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole S.P, Deeley R.G, Keppler D. 1994. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C₄ and structurally related conjugates. *J. Biol. Chem.* 269: 27807-27810.

- Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive F, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A. 1999. Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. *Plant J.* 18: 509-519.
- Leménager D, Ouelhazi L, Mahroug S, Veau B, St-Pierre B, Rideau M, Aguirreolea J, Burlat V, Clastre M. 2005. Purification, molecular cloning, and cell-specific gene expression of the alkaloid-accumulation associated protein CrPS in *Catharanthus roseus*. *J Exp Bot.* 56 : 1221-1228.
- Leslie E.M, Deeley R.G, Cole S.P. 2001. Toxicological relevance of the multidrug resistance Protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology.* 167: 3-23.
- Leslie E.M, Deeley R.G, Cole S.P. 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204: 216-237.
- Levêque D, Wihlm J, Jehl F. 1996. Pharmacology of *Catharanthus* alkaloids. *Bull. Cancer.* 83: 176-186.
- Levy S.B, McMurry L. 1978. Plasmiddetermined tetracycline resistance involves newtransportsystemsfortetracycline. *Nature.* 276: 90-92.
- Lewis H.A, Buchanan S.G, Burley S.K, Connors K, Dickey M, Dorwart M, Fowler R, Gao X, Guggino W.B, Hendrickson W.A, Hunt J.F, Kearins M.C, Lorimer D, Maloney P.C, Post K.W, Rajashankar K.R, Rutter M.E, Sauder J.M, Shriver S, Thibodeau P.H. 2004. Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J.* 23: 282-293.
- Li H, Cai Z, Chen J.H, Ju M, Xu Z, Sheppard D.N. 2007. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel: a versatile engine for transepithelial ion transport. *Sheng Li Xue Bao.* 59:416-430.
- Li L, He Z, Pandey G.K, Tsuchiya T, Luan S. 2002. Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. *The Journal of Biological Chemistry.* 277: 5360-5368.
- Li X.Z, Nikaido H. 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs.* 64:159-204.
- Li X.Z, Nikaido, H. 2009. Efflux-mediated drug resistance in bacteria- An update. *Drugs.* 69: 1555-1623.
- Li Z.S, Szczypka M, Lu Y.P, Thiele D.J, Rea P.A. 1996. The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J. Biol. Chem.* 271: 6509-6517.
- Liang H, Li W.H. 2007. Gene essentiality, gene duplicability and protein connectivity in human and mouse. *Trends Genet.* 23:375-378.
- Liao B.Y, Zhang J. 2007. Mouse duplicate genes are as essential as singletons. *TrendsGenet.* 23: 378-381.

- Lin S.H, Kuo H.F, Canivenc G, Lin C.S, Lepetit M, Hsu P.K, Tillard P, Lin H.L, Wang Y.Y, Tsai C.B, Gojon A, Tsay Y.F. 2008. Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. *Plant Cell*. 20: 2514-2528.
- Linkohr B.I, Williamson L.C, Fitter A.H, Leyser H.M. 2002. Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of Arabidopsis. *Plant J*. 29:751-760.
- Linsdell P. 2006. Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Exp Physiol*. 91: 123-129.
- Linton K.J, Higgins C.F. 2007. Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch*. 453: 555-567.
- Linton K.J, Higgins C.F.1998. The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol.Microbiol*. 28: 5-13.
- Liscovitch M, Lavie Y. 2000. Multidrug resistance: a role for cholesterol efflux pathways? *Trends Biochem Sci*. 25: 530-534.
- Littlejohn T.G, DiBerardino D, Messerotti L.J, Spiers S.J, Skurray R.A. 1991. Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in Staphylococcus aureus. *Gene*. 101: 59-66.
- Liu R, Sharom F.J. 1996. Site-directed fluorescence labeling of Pglycoprotein on cysteine residues in the nucleotide binding domains. *Biochemistry*. 35:11865-11873.
- Locher K.P, Lee A.T, Rees D.C. 2002 .The E. coli BtuCD structure: a framework for ABCtransporter architecture and mechanism. *Science*. 296: 1091-1098.
- Locher K.P. 2004. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol*. 14: 426-431.
- Locher K.P. 2009. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 364: 239-245.
- Loe D.W, K.C. Almquist, R.G. Deeley, S.P. Cole.1996. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J. Biol. Chem*. 271: 9675-9682.
- Loe D.W, Deeley R.G, Cole S.P.C. 1998. Characterization of vincristine transport by the 190 kDa multidrug resistance protein, MRP: evidence for co-transport with reduced glutathione. *Cancer Res*. 58: 5130-5136.

- Loo T, Bartlett M.C, Clarke D.M. 2003. Simultaneous binding of two different drugs in the binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem.* 278: 39706-39710.
- Loo T.W, Bartlett M.C, Clarke D.M. 2003. Methanethiosulfonate derivatives of rhodamine and verapamil activate human P-glycoprotein at different sites. *J Biol Chem.* 278:50136-50141.
- Loo T.W, Bartlett M.C, Clarke D.M. 2004. The drug-binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein is accessible to the aqueous medium. *Biochemistry.* 43: 12081- 2089.
- Loo T.W, Clarke D.M. 2005. Do drug substrates enter the common drug-binding pocket of P-glycoprotein through "gates"? *Biochem Biophys Res Commun.* 329: 419-422.
- Loo T.W. Clarke D.M. 2005. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *J. Membr. Biol.* 206:173-185.
- Löscher W, Potschka H. 2005. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx.* 2:86-98.
- Lu Y.P, Li Z.S, Rea P.A. 1997. AtMRP1 gene of Arabidopsis encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 8243-8248.
- Lu Y.P, Li Z.S, Drozdowicz Y.M, Hörtensteiner S, Martinoia E, Rea P.A. 1998. AtMRP2, an Arabidopsis ATP Binding Cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *The Plant Cell.* 10: 267-282.
- Ma Z, Jacobsen F.E, Giedroc D.P. 2009. Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem Rev.* 109: 4644-4681.
- Mace S, Cousin E, Ricard S, et al. 2005. ABCA2 is a strong genetic risk factor for early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 18:119-125.
- Magalhaes J.V. 2010. How a microbial drug transporter became essential for crop cultivation on acid soils: aluminium tolerance conferred by the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family. *Ann Bot.* 106:199-203.
- Mahroug S, Courdavault V, Thiersault M, St-Pierre B, Burlat V. 2006. Epidermis is a pivotal site of at least four secondary metabolic pathways in *Catharanthus roseus* aerial organs. *Planta.* 223: 1191-1200.
- Mahroug S, Burlat V, St-Pierre B. 2007. Cellular and sub-cellular organisation of the monoterpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry Rev.* 6: 363-381.

- Maki N, Hafkemeyer P, Dey S. 2003. Allosteric modulation of human P-glycoprotein. Inhibition of transport by preventing substrate translocation and dissociation. *J Biol Chem.* 278:18132-18139.
- Malamy J.E, Benfey P.N. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development.* 124: 33-44.
- Maliepaard M, Scheffer G.L, Faneyte I.F, van Gastelen M.A, Pijnenborg A.C, Schinkel A.H, van De Vijver M.J, Scheper R.J, Schellens J.H. 2001. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* 61: 3458-3464.
- Manciu L, Chang X.B, Hou Y.X, Gustot A, Riordan J.R, Ruyschaert J.M. 2003. Intermediate structural states involved in MRP1-mediated drug transport. Role of glutathione. *J Biol Chem.* 278: 3347-3356.
- Mandel L.J. 1986. Primary active sodium transport, oxygen consumption, and ATP: coupling and regulation. *Kidney Int.* 29:3-9.
- Mansfield S. G, Briarty L.G, Erni S. 1991. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. I. The mature embryo sac. *Can. J. Bot.* 69: 447-460.
- Marasini C, Galeno L, Moran O. 2012. Thermodynamic study of the native and phosphorylated regulatory domain of the CFTR. *Biochem Biophys Res Commun.* 423:549-552.
- Markham P.N, and Neyfakh A.A. 2001. Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria. *Curr opin microbiol.* 4: 509-514.
- Martin C, Higgins C.F, Callaghan R. 2001. The vinblastine binding site adopts high- and low-affinity conformations during a transport cycle of P-glycoprotein. *Biochemistry.* 40:15733-42.
- Martinez-Mir A, Paloma E, Allikmets R, Ayuso C, del Rio T, Dean M, Vilageliu L, González-Duarte R, Balcells S. 1998. Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR. *Nat Genet.* 18:11-12.
- Martinoia E, Klein M, Geisler M, Bovet L, Forestier C, Kolukisaoglu U, Muller-Rober B, Schulz B. 2002. Multifunctionality of plant ABC transporters: more than just detoxifiers. *Planta.* 214: 345-355.
- Martinoia E, Grill E, Tommasini R, Kreuz K, Amrhein N. 1993. ATP-dependent glutathione S-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364: 247-249.
- Mason D.L, Michaelis S. 2002. Requirement of the N-terminal extension for vacuolar trafficking and transport activity of yeast Ycf1p, an ATPbinding cassette transporter. *Mol. Biol. Cell.* 13:4443-4455.

- Matsuo T, Nakamura K, Kodama T, Mikami T, Hiyoshi H, Tsuchiya T, Ogawa W, Kuroda T. 2013. Characterization of all RND-type multidrug efflux transporters in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiologyopen*. 2:725-742.
- McCarty N.A, McDonough S, Cohen B.N, Riordan J.R, Davidson N, Lester H.A.. 1993. Voltage-dependent block of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by two closely related arylaminobenzoates. *J Gen Physiol*.102: 1-23.
- McCarty N.A. 2000. Permeation through the CFTR chloride channel. *J Exp Biol*. 203: 1947-1962.
- McDonough S, Davidson N, Lester H.A, McCarty N.A. 1994. Novel pore-lining residues in CFTR that govern permeation and open-channel block. *Neuron*. 13:623-634.
- McFarlane H.E, Shin J.J, Bird D.A, Samuels A.L. 2010. Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *Plant Cell*. 22: 3066-3075.
- McKnight T.D, Bergey D.R, Burnett R.J, Nessler C.L. 1991. Expression of an enzymatically active and correctly targeted strictosidine synthase in transgenic tobacco plants. *Planta*. 185: 148-152.
- Mercier C, Massequin C, Roux F, Gabrion J, Scherrmann J.M. 2004. Expression of Pglycoprotein (ABCB1) and Mrp1 (ABCC1) in adult rat brain: focus on astrocytes. *Brain Res*. 1021:32-40.
- Merillon J.M, Rideau M, Chenieux J.C. 1984. Influence of sucrose on levels of ajmalicine, serpentine, and tryptamine in *Catharanthus roseus* cells in vitro. *Planta Med*. 50: 497-501.
- Mishra P, Kumar S. 2000. Emergence of periwinkle *Catharanthus roseus* as a model system for molecular biology of alkaloids: phytochemistry, pharmacology, plant biology and in vitro and in vivo cultivation. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*. 22: 306-337.
- Miura K, Rus A, Sharkhuu A, Yokoi S, Karthikeyan AS, Raghothama Kashchandra G, Baek D, Koo YD, Jin JB, Bressan RA, et al. 2005. The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 7760-7765.
- Miyashima S, Sebastian J, Lee J.Y, Helariutta Y. 2013. Stem cell function during plant vascular development. *EMBO J*. 32:178-193.
- Mo W, Zhang T.J. 2012. Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int J Biochem Mol Biol*. 3: 1-27.

- Moody J.E, Millen L, Binns D, Hunt J.F, Thomas P.J. 2002. Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J. Biol. Chem.* 277:21111-21114.
- Moriyama Y, Hiasa M, Matsumoto T, Omote H. 2008. Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type proteins as anchor transporters for the excretion of metabolic waste products and xenobiotics. *Xenobiotica.* 38:1107-1118.
- Moubayidin L, Perilli S, Dello Ioio R, Di Mambro R, Costantino P, Sabatini S. 2010. The rate of cell differentiation controls the Arabidopsis root meristem growth phase. *Curr. Biol.* 20: 1138-1143
- Mouillon J.M, Persson B.L. 2006. New aspects on phosphate sensing and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 6:171-176.
- Mourez M, Hofnung M, Dassa E. 1997. Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membraneproteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPasesubunits. *EMBO J.* 16:3066-3077.
- Multani D.S, Briggs S.P, Chamberlin M.A, Blakeslee J.J, Murphy A.S, Johal G.S. 2003. Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize br2 and sorghum dw3 mutants. *Science.* 302: 81-84.
- Murata J, Roepke J, Gordon H, De LucaV, 2008. The leaf epidermome of *Catharanthus roseus* reveals its biochemical specialization. *Plant Cell.* 20: 524-542.
- Nagy R, Grob H, Weder B, Green P, Klein M, Frelet-Barrand A, Schjoerring JK, Brearley C, Martinoia E. 2009. The Arabidopsis ATP-binding cassette protein AtMRP5/AtABCC5 is a high affinity inositol hexakisphosphate transporter involved in guard cell signaling and phytate storage. *J Biol Chem.* 284: 33614-33622.
- Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, Hayashi K, Nagata C, Hoshino K, Onodera Y, Nishino K, Yamaguchi A. 2013. Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. *Nature.* 500:102-106.
- Nakaune R.K. Adachi, O. Nawata, M. Tomiyama, K. Akutsu, T. Hibi. 1998. A novel ATP-binding cassette transporter involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitum*. *Appl. Environ. Microb.* 64:3983-3988.
- Naramoto H, Uematsu T, Uchihashi T, Doto R, Matsuura T, Usui Y, Uematsu S, Li X, Takahashi M, Yamaoka M, Furusawa K. 2007. Multidrug resistance-associated protein 7 expression is involved in cross-resistance to docetaxel in salivary gland adenocarcinoma cell lines. *Int J Oncol.* 30: 393-401.
- NawyT, Lukowitz W, Bayer M. 2008. Talk global, act local-patterning the Arabidopsis embryo. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 28-33.

- Neumann L, Abele R, Tampé R. 2002. Thermodynamics of peptide binding to the transporter associated with antigen processing (TAP). *J Mol Biol.* 324:965-973.
- Newstead S, Fowler P.W, Bilton P, Carpenter E.P, Sadler P.J, Campopiano D.J, Sansom M.S, Iwata S. 2009. Insights into how nucleotide-binding domains power ABC transport. *Structure.* 17:1213-1222.
- Ng Wing Tin S, Martin-Duverneuil N, Idbaih A, Garel C, Ribeiro M, Landman Parker J, Defachelles A.S et al. 2011. Efficacy of vinblastine in central nervous system Langerhans cell histiocytosis: a nationwide retrospective study. *Orphanet J Rare Dis.* 6: 83.
- Nieuwland J, Maughan S, Dewitte W, Scofield S, Sanz L, Murray J.A.H. 2009. The D- type cyclin CYCD4:1 modulates lateral root density in Arabidopsis by affecting the basal meristem region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 22528-22533.
- Niinuma K, Kato Y, Suzuki H, Tyson CA, Weizer V, Dabbs JE, Froehlich R, Green CE, Sugiyama Y. 1999. Primary active transport of organic anions on bile canalicular membrane in humans. *Am J Physiol.* 276: G1153-G1164.
- Noble R.L, Beer C.T, Cutts J.H. 1958. Role of chance observations in chemotherapy: Vinca rosea. *Ann N Y Acad Sci.* 76: 882-894.
- Noble R. 1990. The discovery of vinca alkaloids - chemotherapeutic agents against cancer. *Biochem. Cell. Biol.* 68: 344-1351.
- Noh B, Murphy A.S, Spalding E.P. 2001. Multidrug resistance-like genes of Arabidopsis required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell.* 13: 2441-2454.
- Ohene-Agyei T, Lea J.D, Venter H. 2012. Mutations in MexB that affect the efflux of antibiotics with cytoplasmic targets. *FEMS Microbiol Lett:* 333: 20-27.
- Oldham M.L, Chen J. 2011. Snapshots of the maltose transporter during ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:15152-15156.
- Oldham M.L, Davidson A.L, Chen J. 2008. Structural insights into ABC transporter mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18:726-733.
- Oliveira A.S, Baptista A.M, Soares C.M. 2011. Inter-domain communication mechanisms in an ABC importer: a molecular dynamics study of the MalFGK2E complex. *PLoS Comput Biol.* 7: e1002128.
- Omote H, Hiasa M, Matsumoto T, Otsuka M, Moriyama Y. 2006. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol Sci.* 27:587-593.
- Orsi C.H, Tanksley S.D. 2009. Natural variation in an ABC transporter gene associated with seed size evolution in tomato species. *PLoS Genet.* 5:e1000347.

- Ostedgaard L.S, Baldursson O, Welsh M.J. 2001. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by its R domain. *J Biol Chem.* 276: 7689-7692.
- Oswald C, Holland I.B, Schmitt L. 2006. The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us? *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 372:385-399.
- Otegui M.S, Capp R, Staehelin L.A. 2002. Developing seeds of *Arabidopsis* store different minerals in two types of vacuoles and in the endoplasmic reticulum. *Plant Cell.* 14:1311-1327.
- Oudin A, Mahroug S, Courdavault V, Hervouet N, Zelwer C, Rodríguez-Concepción, M, St-Pierre B, Burlat V. 2007. Spatial distribution and hormonal regulation of gene products from methyl erythritol phosphate and monoterpene-secoiridoid pathways in *Catharanthus roseus*. *Plant Mol Biol.* 65: 13-30.
- Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T. 2010. Auxin Control of Root Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2: a001537.
- Page D.R, Grossniklaus U. 2002. The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Rev. Genet.* 3: 124-136.
- Pao S.S, Paulsen I.T, Saier M.H Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62:1-34.
- Papp B, Pal C, Hurst L.D. 2003. Dosage sensitivity and the evolution of gene families in yeast. *Nature.* 424: 194-197.
- Parizot B, Laplaze L, Ricaud L, Boucheron-Dubuisson E, Bayle V, Bonke M, De Smet I, Poethig S.R, Helariutta Y, Haseloff J, Chriqui D, Beeckman T, Nussaume L. 2008. Diarch symmetry of the vascular bundle in *Arabidopsis* root encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation. *Plant Physiol.* 146:140-148.
- Paumi C.M, Chuk M, Snider J, Stagljar I, Michaelis S. 2009. ABC Transporters in *Saccharomyces cerevisiae* and Their Interactors: New technology advances the biology of the ABCC (MRP) subfamily. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73:577-593.
- Peelman F, Labeur C, Vanloo B, Roosbeek S, Devaud C, Duverger N, Denèfle P, Rosier M, Vandekerckhove J, Rosseneu M. 2003. Characterization of the ABCA Transporter Subfamily: Identification of Prokaryotic and Eukaryotic Members, Phylogeny and Topology. *J. Mole. Biol.* 325:259-274.
- Penfield S, Graham S, Graham I.A. 2005. Storage reserve mobilization in germinating oilseeds: *Arabidopsis* as a model system. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 380-383.

- Pennings E.J, van den Bosch R.A, van der Heijden R, Stevens L.H, Duine J.A, Verpoorte R. 1989. Assay of strictosidine synthase from plant cell cultures by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 176: 412-415.
- Perry L.M, Metzger J. 1980. *Medicinal Plants of East and South-east Asia: Attributed Properties and Uses.* ISBN 10: 0262160765
- Persson B.L, Berhe A, Fristedt U, Martinez P, Pattison J, Petersson J, Weinander R. 1998. Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1365: 23-30.
- Piddock L.J. 2006. Multidrug-resistance efflux pumps-not just for resistance. *Nat Rev Microbiol.* 4: 629-636.
- Piehler A.P, Hellum M, Wenzel J.J, Kaminski E, Haug K.B, Kierulf P, Kaminski W.E. 2008. The human ABC transporter pseudogene family: evidence for transcription and gene-pseudogene interference. *BMC Genomics* 9: 165.
- Piehler A.P, Wenzel J. J, Olstad O.K, Haug K.B, Kierulf P, Kaminski W.E. 2006. The human ortholog of the rodent testis-specific ABC transporter *Abca17* is a ubiquitously expressed pseudogene (*ABCA17P*) and shares a common 5' end with *ABCA3*. *BMC Mol. Biol.* 7: 28.
- Piehler A.P, Ozcürümez M, Kaminski W.E. 2012. A Subclass ATP-Binding Cassette Proteins in Brain Lipid Homeostasis and Neurodegeneration. *Front Psychiatry.* 3:17.
- Pilu R, Panzeri D, Gavazzi G, Rasmussen S.K, Consonni G, Nielsen E. 2003. Phenotypic, genetic and molecular characterization of a maize low phytic acid mutant (*lpa241*). *Theor Appl Genet.* 107:980-987.
- Pinkett H.W, Lee A.T, Lum P, Locher K.P, Rees D.C. 2007. An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter. *Science.* 315:373-377.
- Pisarev A.V, Skabkin M.A, Pisareva V.P, Skabkina O.V, Rakotondrafara A.M, Hentze M.W, Hellen C.U.T, Pestova T.V. 2010. The Role of *ABCE1* in Eukaryotic Posttermination Ribosomal Recycling. *Molecular Cell.* 37:196-210.
- Poget S.F, Harris R, Cahill S.M, Girvin M.E. 2010. ¹H, ¹³C, ¹⁵N backbone NMR assignments of the *Staphylococcus aureus* small multidrug-resistance pump (*Smr*) in a functionally active conformation. *Biomol NMR Assign.* 4:139-142.
- Pomahacová B, Dusek J, Dusková J, Yazaki K, Roytrakul S, Verpoorte R. 2009. Improved accumulation of ajmalicine and tetrahydroalstonine in *Catharanthus* cells expressing an ABC transporter. *J Plant Physiol.* 166:1405-1412.
- Poole K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 10: 12-26.

- Poulsen B.E, Deber C.M. 2012. Drug efflux by a small multidrug resistance protein is inhibited by a transmembrane peptide. *Antimicrob Agents Chemother.* 56: 3911-3916.
- Prasad R, K Kapoor. 2005. Multidrug resistance in yeast *Candida*. *Int. Rev. Cytol.* 242: 215–248.
- Pushpakom S.P, Liptrott N.J, Rodríguez-Nóvoa S, Labarga P, Soriano V, Albalater M, Hopper-Borge E, Bonora S, Di Perri G, Back D.J, Khoo S, Pirmohamed M, Owen A. 2011. Genetic variants of ABCB10, a novel tenofovir transporter, are associated with kidney tubular dysfunction. *J. Infect Dis.* 204:145-153.
- Putman M, van Veen H.W, Konings W.N. 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 64:672-693.
- Raboy V, Gerbasi P.F, Young K.A, Stoneberg S.D, Pickett S.G, Bauman A.T, Murthy P.P, Sheridan W.F, Ertl D.S. 2000. Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. *Plant Physiol.* 124:355-368.
- Raboy V. 2002. Progress in breeding low phytate crops. *J Nutr.* 132:503S-505S.
- Raichaudhuri A, Peng M, Naponelli V, Chen S, Sánchez-Fernández R, Gu H, Gregory J.F 3rd, Hanson A.D, Rea P.A. 2009. Plant vacuolar ATP-binding Cassette transporters that translocate folates and antifolates in vitro and contribute to antifolate tolerance in vivo. *J. Biol. Chem.* 284: 8449-8460.
- Randak C, Auerswald E.A, Assfalg-Machleidt I, Reenstra W.W, Machleidt W. 1999. Inhibition of ATPase, GTPase and adenylate kinase activities of the second nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by genistein. *Biochem J.* 340: 227-235.
- Randak C, Neth P, Auerswald E.A, Assfalg-Machleidt I, Roscher A.A, Hadorn H.B, Machleidt W. 1996. A recombinant polypeptide model of the second predicted nucleotide binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a GTP-binding protein. *FEBS Lett.* 398: 97-100.
- Raviv Y, Puri A, Blumenthal R. 2000. P-glycoprotein-overexpressing multidrug-resistant cells are resistant to infection by enveloped viruses that enter via the plasma membrane. *FASEB J.* 14:511-515.
- Rea P.A. 2007. Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:347-375.
- Rea P.A, Li Z.S, Lu Y.P, Drozdowicz Y.M, Martinoia E. 1998. From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 49: 727-760.
- Reddy V.S, Shlykov M.A, Castillo R, Sun E.I, Saier M.H Jr. 2012. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *FEBS J.* 279: 2022-2035.

- Rees D.C, Johnson E, Lewinson O. 2009. ABC transporters: the power to change. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10: 218-227.
- Reimer R.J, Edwards R.H. 2004. Organic anion transport is the primary function of the SLC17/type I phosphate transporter family. *Pflugers Arch.* 447: 629-635.
- Renes J, de Vries E.G, Nienhuis E.F, Jansen P.L, Müller M. 1999. ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1. *Br. J. Pharmacol.* 126: 681-688.
- Rensing, S.A et al., 2008. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science.* 319: 64-69.
- Reuter G, Janvilisri T, Venter H, Shahi S, Balakrishnan L, van Veen H.W. 2003. The ATP binding cassette multidrug transporter LmrA and lipid transporter MsbA have overlapping substrate specificities. *J Biol Chem.* 278: 35193-35198.
- Riordan J.R, Rommens J.M, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, et al. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 245:1066-1073.
- Rodríguez-Gacio Mdel C, Matilla-Vázquez M.A, Matilla A.J. 2009. Seed dormancy and ABA signaling: the breakthrough goes on. *Plant Signal Behav.* 4:1035-1049.
- Roelofsen H, Vos T.A, Schippers I.J, Kuipers F, Koning H, Moshage H, Jansen P.L and MullerM .1997. Increased levels of the multidrug resistance protein in lateral membranes of proliferating hepatocyte-derived cells. *Gastroenterology.* 112:511-521.
- Roepke J, Salim V, Wu M, Thamm A.M, Murata J, Ploss K, Boland W, De Luca V. 2010. Vinca drug components accumulate exclusively in leaf exudates of Madagascar periwinkle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S .A.* 107:15287-15292.
- Roosbeek S, Peelman F, Verhee A, Labeur C, Caster H, Lensink M.F, Cirulli C, Grooten J, Cochet C, Vandekerckhove J, Amoresano A, Chimini G, Tavernier J, Rosseneu M. 2004. Phosphorylation by protein kinase CK2 modulates the activity of the ATP binding cassette A1 transporter. *J Biol Chem.* 279: 37779-37788.
- Rudin D, Li L, Niu N, Kalari, KR, Gilbert J.A, Ames M.M, Wang L. 2011. Gemcitabine Cytotoxicity: Interaction of Efflux and Deamination. *J Drug Metab Toxicol.* 2: 1-10.
- Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette J.C, Deleuze J.F, Brewer Jr. H.B, Duverger N, Denèfle P, Assmann G. 1999. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet.* 22:352-355.

- Rybel B.D, Breda A.S, Weijers D. 2013. Prenatal plumbing - vascular tissue formation in the plant embryo. *Physiol Plant*. [Epub ahead of print]
- Sahu P.K, Iyer P.S, Gaikwad M.B, Talreja S.C, Pardesi K.R, Chopade B.A. 2012. An MFS Transporter-Like ORF from MDR *Acinetobacter baumannii* AIIMS 7 Is Associated with Adherence and Biofilm Formation on Biotic/Abiotic Surface. *Int J Microbiol*. 2012:490647.
- Saier M.H Jr, Paulsen I.T, Sliwinski M.K, Pao S.S, Skurray R.A, Nikaido H. 1998. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J*. 12: 265-274.
- Saier M.H, Jr Beatty J.T, Goffeau A, Harley K.T, Heijne W.H, et al. 1999. The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 1: 257-279.
- Sakai K, Shitan N, Sato F, Ueda K, Yazaki K. 2002. Characterization of berberine transport into *Coptis japonica* cells and the involvement of ABC protein. *J Exp Bot*. 53:1879-1886.
- Samuels L, Kunst L, Jetter R. 2008. Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu Rev Plant Biol*. 59: 683-707.
- Sánchez-Fernández R, Davies T.G, Coleman J.O, Rea P.A. 2001. The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J. Biol. Chem*. 276: 3023-3044.
- Sauna Z.E, Ambudkar S.V. 2000. Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 97: 2515-2520.
- Sauna Z.E, Ambudkar S.V. 2007. About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work. *Mol. Cancer Ther*. 6:13-23.
- Saurin W, Hofnung M, Dassa E. 1999. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol*. 48: 22-41.
- Schinkel A. H, Jonker J. W. 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family, an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 55:3-29.
- Schmidt A.L, Briskin D.P. 1993. Reversal of the red beet tonoplast H(+)-ATPase by a pyrophosphate-generated proton electrochemical gradient. *Arch Biochem Biophys*. 306: 407-414.
- Schmitz G, Liebisch G, Langmann T. 2006. Lipidomic strategies to study structural and functional defects of ABC-transporters in cellular lipid trafficking. *FEBS Lett*. 580:5597-5610.

- Schneider E, Hunke S. 1998. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits /domains. *FEMS Microbiol Rev.* 22:1-20.
- Schuldiner S. 2009. EmrE, a model for studying evolution and mechanism of ion-coupled transporters. *Biochim. Biophys. Acta* .1794:748-762.
- Schülein, R. 2004. The early stages of the intracellular transport of membrane proteins: clinical and pharmacological implications. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 151: 45-91.
- Schulz B, Kolukisaoglu H.U. 2006. Genomics of plant ABC transporters: The alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes? *FEBS Lett.* 580: 1010-1016.
- Schwiebert E M, Morales M.M, Devidas S, Egan M.E, Guggino W.B. 1998. Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci.* 95: 2674-2679.
- Sehr E.M, Agusti J, Lehner R, Farmer E.E, Schwarz M, Greb T. 2010. Analysis of secondary growth in the Arabidopsis shoot reveals a positive role of jasmonate signaling in cambium formation. *Plant J.* 63:811-822.
- Senior A.E and Gadsby D.C. 1997. ATP hydrolysis cycles and mechanism in Pglycoprotein and CFTR. *Semin Cancer Biol.* 8:143-150.
- Senior A.E, Bhagat S. 1998. P-glycoprotein shows strong catalytic cooperativity between the two nucleotide sites. *Biochemistry.* 37:831-836.
- Seo P.J, Park J, Park M.J, Kim Y.S, Kim S.G, Jung J.H, Park C.M. 2012. A Golgi-localized MATE transporter mediates iron homeostasis under osmotic stress in Arabidopsis. *Biochem J.* 442:551-61.
- Shani E, Weinstain R, Zhang Y, Castillejo C, Kaiserli E, Chory J, Tsien R.Y, Estelle M. 2013. Gibberellins accumulate in the elongating endodermal cells of Arabidopsis root. *PNAS.* 110: 4834-4839.
- Shechter E. 1986. Secondary active transport. *Biochimie.* 68:357-65.
- Sheppard D.N, Welsh M.J. 1999. Structure and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Physiol Rev* .79: S23-S45.
- Sheps J.A, Ralph S, Zhao Z, Baillie D.L, Ling V. 2004. The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol.* 5: R15.

- Shi Y. 2013. Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annu Rev Biophys.* 42:51-72.
- Shi J, Wang H, Schellin K, Li B, Faller M, Stoop J.M, Meeley R.B, Ertl D.S, Ranch J.P, Glassman K. 2007. Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nat. Biotechnol.* 25 : 930-937.
- Shilling R.A, Venter H, Velamakanni S, Bapna A, Woebking B, Shahi S, van Veen H.W. 2006. *Trends Pharmacol Sci.* 4:195-203.
- Shitan N, Dalmas F, Dan K, Kato N, Ueda K, Sato F, Forestier C, Yazaki K. 2013. Characterization of *Coptis japonica* CjABCB2, an ATP-binding cassette protein involved in alkaloid transport. *Phytochemistry.* 91:109-116.
- Shulenin S, Noguee L.M, Annilo T, et al. 2004. ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med.* 350:1296-1303.
- Shuman H.A. 1982. Active transport of maltose in *Escherichia coli* K12. Role of the periplasmic maltose-binding protein and evidence for a substrate recognition site in the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem.* 257: 5455-5461.
- Shyamala V, Baichwal V, Beall E, Ames GF. 1991. Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J Biol Chem.* 266:18714-18719.
- Siest G, Marteau J.B, Maumus S, Berrahmoune H, Jeannesson E, Samara A, Batt A.M and Visvikis-Siest S. 2005. Pharmacogenomics and cardiovascular drugs: need for integrated biological system with phenotypes and proteomic markers. *Eur J Pharmacol.* 527:1-22.
- Sipos G, Kuchler K. 2006. Fungal ATP-binding cassette (ABC) transporters in drug resistance & detoxification. *Curr Drug Targets.* 7:471-481.
- Sisodiya S. M, Lin W. R, Harding B. N, Squier M. V, Thom M. 2002. Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain.* 125: 22-31.
- Smaczny C, Born T, Wagner T.O. 2012. Emergencies in adult mucoviscidosis patients. *Internist (Berl).* 53: 575-584.
- Song W.Y, Park J, Mendoza-Cózatl D.G, Suter-Grotemeyer M, Shim D, Hörtensteiner S, Geisler M, Weder B, Rea P.A, Rentsch D, Schroeder J.I, Lee Y, Martinoia E. 2010. Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107: 21187-21192.
- Sonveaux N, Vigano C, Shapiro A.B, Ling V, Ruysschaert J.M .1999. Ligand-mediated tertiary structure changes of reconstituted P-glycoprotein. A tryptophan fluorescence quenching analysis. *J Biol Chem.* 274:17649-17654.

- Sottomayor M, Lopez-Serrano M, DiCosmo F, Ros Barcelo A. 1998. Purification and characterization of α -3', 4'-anhydrovinblastine synthase (peroxidase-like) from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. FEBS Lett. 428: 299-303.
- Sottomayor M, Ros Barcelo A. 2003. Peroxidase from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don and the biosynthesis of α -3', 4'-anhydrovinblastine: a specific role for a multifunctional enzyme. Protoplasma. 222: 97-105.
- Speiser D.M, Ames G.F. 1991. Salmonella typhimurium histidine periplasmic permease mutations that allow transport in the absence of histidine-binding proteins. J Bacteriol. 173: 1444-1451.
- Stearn, T., 1975. The *Catharanthus* alkaloid.
- St-Pierre B, Vazquez-Flota F.A, De Luca V. 1999. Multicellular compartmentation of *Catharanthus roseus* alkaloid biosynthesis predicts intercellular translocation of a pathway intermediate. Plant Cell. 11: 887-900.
- St-Pierre B, Brisson N. 1995. 5' deletion analysis of the potato starch phosphorylase gene: an upstream sequence defines distal regulatory elements and a proximal organ-dependent promoter. Plant Science. 110: 193-203.
- St-Pierre B, Laflamme P, Alarco A.M, De Luca V, 1998. The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. Plant J. 14: 703-713.
- Stukkens Y, Bultreys A, Grec S, Trombik T, Vanham D, Boutry M. 2005. NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana glauca*, plays a major role in plant pathogen defense. Plant Physiol. 139:341-52.
- Stukkens Y, Bultreys A, Grec S, Trombik T, Vanham D, Boutry M. 2005. NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana glauca*, plays a major role in plant pathogen defense. Plant Physiol. 139: 341-352.
- Suetani R.J, Sorrenson B, Tyndall J.D, Williams M.J, McCormick S.P. 2011. Homology modeling and functional testing of an ABCA1 mutation causing Tangier disease. Atherosclerosis. 218:404-410.
- Suh SJ, Wang YF, Frelet A, Leonhardt N, Klein M, Forestier C, Mueller-Roeber B, Cho MH, Martinoia E, Schroeder JI. 2007. The ATP binding cassette transporter AtMRP5 modulates anion and calcium channel activities in *Arabidopsis* guard cells. Biol Chem. 282:1916-1924.
- Sukumar K, Osmani Z. 1981. Insect sterilants from *Catharanthus roseus*. Current Sci. 50: 552-553.

- Sun X, Gilroy E.M, Chini A, Nurmberg P.L, Hein I, Lacomme C, Birch P.R, Hussain A, Yun B.W, Loake G.J. 2011. ADS1 encodes a MATE-transporter that negatively regulates plant disease resistance. *New Phytol.* 192:471-482.
- Park S, Lim B.B, Perez-Terzic C, Mer G, Terzic A. 2008. Interaction of Asymmetric ABCC9-Encoded Nucleotide Binding Domains Determines KATP Channel SUR2A Catalytic Activity. *J Proteome Res.* 7:1721-1728.
- Suttipanta N, Pattanaik S, Kulshrestha M, Patra B, Singh S.K, Yuan L. 2011. The Transcription Factor CrWRKY1 Positively Regulates the Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* 157:2081-2093.
- Sze H, Li X.H, Palmgren M.G. 1999. Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell.* 11: 677-689.
- Tabcharani J.A, Chang X.B, Riordan J.R, Hanrahan J.W. 1992. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. Iodide block and permeation. *Biophys J.* 62: 1-4.
- Tânia R. Cabrito, Miguel C. Teixeira, Ashutosh Singh, Rajendra Prasad, Isabel Sá-Correia. 2011. The yeast ABC transporter Pdr18 (ORF YNR070w) controls plasma membrane sterol composition, playing a role in multidrug resistance. *Biochem J.* 440: 195-202.
- Terasaka K, Blakeslee J.J, Titapiwatanakun B, Peer W.A, Bandyopadhyay A, Makam S.N, Lee O.R, Richards E.L, Murphy A.S, Sato F, Yazaki K. 2005. ABCB4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell* .17: 2922-2939.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* 408: 796-815
- Tommasini, R., Vogt, E., Fromenteau, M., Hörtensteiner, S., Matile, P., Amrhein, N., Martinoia, E.: An ABC-transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. - *Plant J.* 13: 773-780, 1998.
- Tsuda M, Terada T, Mizuno T, Katsura T, Shimakura J, Inui K. 2009. Targeted Disruption of the Multidrug and Toxin Extrusion 1 (MATE1) Gene in Mice Reduces Renal Secretion of Metformin. *Mol Pharmacol.* 75:1280-1286.
- Tuominen H, Puech L, Fink S, Sundberg B. 1997. A radial concentration gradient of indole-3-acetic acid is related to secondary xylem development in hybrid aspen. *Plant Physiol.* 115: 577-585.
- Tusnády G.E, Sarkadi B, Simon I, Váradi A. 2006. Membrane topology of human ABC proteins. *FEBS Lett.* 580:1017-1022.

- Tusnady G.E, Bakos E, Varadi A, Sarkadi B. 1997. Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett.* 402:1-3.
- Twentyman P.R, Bleehen N.M. 1991. Resistance modification by PSC-833, a novel non-immunosuppressive cyclosporin. *Eur. J. Cancer.* 27: 1639-1642.
- Ubeda-Tomás S, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplaze L, Beemster G.T, Hedden P, Bhalerao R, Bennett M.J. 2008. Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nat. Cell Biol.* 10: 625-628.
- Ueda K, Komine J, Matsuo M, Seino S, Amachi T. 1999. Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulfonylurea receptor is modulated by glibenclamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 96:1268-1272.
- Uggla C, Moritz T, Sandberg G, Sundberg B.1996. Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 9282-9286.
- Van Der Heijden R, Jacobs D.I, Snoeijer W, Hallard D, Verpoorte R. 2004. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Curr Med Chem.* 11: 607-628.
- Van Veen H.W, Callaghan R, Soceneatu L, Sardini A, Konings W.N, Higgins CF.1998. A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. *Nature.* 391: 291-295.
- Van Veen H.W, Konings W.N. 1998. The ABC family of multidrug transporters in microorganisms. *Biochim Biophys Acta.* 1365: 31-36.
- Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert D.W. 2009. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human genomics.* 3: 281-290.
- Vazquez de Aldana C.R, Marton M.J, Hinnebusch A.G. 1995. GCN20, a novel ATP binding cassette protein, and GCN1 reside in a complex that mediates activation of the eIF-2 alpha kinase GCN2 in amino acid-starved cells. *EMBO J.* 14: 3184-3199.
- Vazquez-Flota F, De Carolis E, Alarco A.M, De Luca V. 1997. Molecular cloning and characterization of desacetoxylvindoline-4-hydroxylase, a 2-oxoglutarate dependent-dioxygenase involved in the biosynthesis of vindoline in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Plant Mol Biol.* 34: 935-948.
- Veitia R.A. 2002. Exploring the etiology of haploinsufficiency. *BioEssays.* 24: 175-184.
- Veitia R.A, Bottani S, Birchler J.A. 2008. Cellular reactions to gene dosage imbalance: genomic, transcriptomic and proteomic effects. *Trends Genet.* 24: 390-397.

- Vergani P, Lockless S.W, Nairn A.C, Gadsby D.C. 2005. CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature* .433: 876-880.
- Verma A.K, Singh R.R. 2010. Induced Dwarf Mutant in *Catharanthus roseus* with Enhanced Antibacterial Activity. *Indian J Pharm Sci.*72: 655-657.
- Verrier P.J, Bird D, Burla B, Dassa E, Forestier C, Geisler M, Klein M, Kolukisaoglu U, Lee Y, Martinoia E, Murphy A, Rea P.A, Samuels L, Schulz B, Spalding E.J, Yazaki K, Theodoulou F.L. 2008. Review Plant ABC proteins--a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci.* 13:151-159.
- Vinoth S, Gurusaravanan P, Jayabalan N. 2013. Optimization of factors influencing microinjection method for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tomato. *Appl Biochem Biotechnol.* 169:1173-1187.
- Virmani O.P, Srivastava G.N, Singh P. 1978. *Catharanthus roseus*. The Tropical Periwinkle. *Indian Drugs.* 15: 231-252.
- Vlaming M.L, Lagas J.S, Schinkel A.H. 2009. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. *Adv Drug Deliv Rev.* 61:14-25.
- Vogelgesang S, Cascorbi I, Schroeder E, Pahnke J, Kroemer H.K , Siegmund W, Kunert-Keil C, Walker L.C, Warzok R.W. 2002. Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics.* 12: 535-541.
- Walker J.E, Saraste M, Runswick M.J, Gay N.J. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide-binding fold. *EMBO J.* 1:945-951.
- Wang R, Tischner R, Gutiérrez RA, Hoffman M, Xing X, Chen M, Coruzzi G, Crawford NM. 2004. Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 136: 2512-2522.
- Wang Y.Y, Tsay Y.F. 2011. *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.9 is important in phloem nitrate transport. *Plant Cell.* 23:1945-1957.
- Wang G. 2010. State-dependent regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gating by a high affinity Fe³⁺ bridge between the regulatory domain and cytoplasmic loop 3. *J Biol Chem.* 285:40438-40447.
- Wanke D, Kolukisaoglu H.U. 2010. An update on the ABCC transporter family in plants: many genes, many proteins, but how many functions? *Plant Biol.* 1:15-25.
- Ward A, Reyes C.L, Yu J, Roth C.B, Chang G. 2007. Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 19005-19010.

- Wawrzycka D. 2011. The ABC transporters of *Saccharomyces cerevisiae*. *Postepy Biochem.* 57: 324-332.
- Westlake C.J, Cole S.P, Deeley R.G. 2005. Role of the NH₂-terminal membrane spanning domain of multidrug resistance protein 1/ABCC1 in protein processing and trafficking. *Mol. Biol. Cell.* 16: 2483-2492.
- Westlake C.J, Qian Y.M, Gao M, Vasa M, Cole S.P, Deeley R.G. 2003. Identification of the structural and functional boundaries of the multidrug resistance protein 1 cytoplasmic loop 3. *Biochemistry.* 42:14099-14113.
- Widiez T, El Kafafi el S, Girin T, Berr A, Ruffel S, Krouk G, Vayssières A, Shen WH, Coruzzi GM, Gojon A, Lepetit M. 2011. High nitrogen insensitive 9 (HNI9)-mediated systemic repression of root NO₃- uptake is associated with changes in histone methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 108:13329-13334.
- Wigley W.C, Vijayakumar S, Jones J.D, Slaughter C, Thomas P.J. 1998. Transmembrane domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: design, characterization, and secondary structure of synthetic peptides m1-m6. *Biochemistry.* 37: 844-853.
- Wijnholds J, deLange E.C, Scheffer G.L, van den Berg D.J, Mol C.A, van der Valk M, Schinkel A.H, Scheper R.J, Breimer D. D, Borst P. 2000. Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J. Clin. Invest.* 105: 279-285.
- Wing-Cheong Wong, Sebastian Maurer-Stroh, Frank Eisenhaber. 2011. Not all transmembrane helices are born equal: Towards the extension of the sequence homology concept to membrane proteins. *Biol Direct.* 6: 57.
- Wink M, Ashour M.L, El-Readi M.Z. 2012. Secondary Metabolites from Plants Inhibiting ABC Transporters and Reversing Resistance of Cancer Cells and Microbes to Cytotoxic and Antimicrobial Agents. *Front Microbiol.* 3:130.
- Wojas S, Hennig J, Plaza S, Geisler M, Siemianowski O, Skłodowska A, Ruszczyńska A, Bulska E, Antosiewicz D.M. 2007. Ectopic expression of Arabidopsis ABC transporter MRP7 modifies cadmium root-to-shoot transport and accumulation. *Environ. Pollut.* 157: 2781-2789.
- Wojas S, Hennig J, Plaza S, Geisler M, Siemianowski O, Skłodowska A, Ruszczyńska A, Bulska E, Antosiewicz D.M. 2009. Ectopic expression of Arabidopsis ABC transporter MRP7 modifies cadmium root-to-shoot transport and accumulation. *Environ. Pollut.* 157: 2781-2789.

- Xing S.H, Guo X.B, Wang Q, Pan Q.F, Tian Y.S, Liu P, Zhao J.Y, Wang G.F, Sun X.F, Tang K.X. 2011. Induction and flow cytometry identification of tetraploids from seed-derived explants through colchicine treatments in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *J Biomed Biotechnol.* 2011:793198.
- Yazaki K, Shitan N, Sugiyama A, Takanashi K. 2009. Cell and molecular biology of ATP-binding cassette proteins in plants. *Int. Rev Cell Mol. Biol.* 276: 264-299.
- Yazaki K. 2006. ABC transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. *FEBS Lett.* 580: 1183-1191.
- Yazaki K, Yamanaka N, Masuno T, Konagai S, Shitan N, Kaneko S, Ueda K, Sato F. 2006. Heterologous expression of a mammalian ABC transporter in plant and its application to Phytoremediation. *Plant Mol. Biol.* 61: 491-503.
- Yoo S.D, Cho Y.H, Sheen J. 2007. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* 2 : 1565-1572.
- You G, Morris M.E. 2007. *Drug Transporters- Molecular Characterization and Role in Drug Disposition.* ISBN 9780471.
- Yu F, De Luca V. 2013. ATP-binding cassette transporter controls leaf surface secretion of anticancer drug components in *Catharanthus roseus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110:15830-15835.
- Yuan Y.R, Blecker S, Martsinkevich O, Millen L, Thomas P.J, Hunt J.F. 2001. The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette - Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter. *J Biol Chem.* 276: 32313-32321.
- Zager R.A. 2001. P glycoprotein-mediated cholesterol cycling determines proximal tubular cell viability. *Kidney Int.* 60:944-956.
- Zhang J. 2003. Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol Evol.* 18:292-298.
- Zhang J.T. 2007. Use of arrays to investigate the contribution of ATP-binding cassette transporters to drug resistance in cancer chemotherapy and prediction of chemosensitivity. *Cell Res.* 17: 311-323.
- Zhang Y, Schuetz J.D, Elmquist W.F, Miller D.W. 2004. Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologs in brain capillary endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311: 449-455.
- Zhou M.L, Shao J.R, Tang Y.X. 2009. Production and metabolic engineering of terpenoid indole alkaloids in cell cultures of the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Madagascar periwinkle). *Biotechnol Appl Biochem.* 52: 313-323.

- Zhu W, Brendel V. 2003. Identification, characterization and molecular phylogeny of U12 dependent introns in the *Arabidopsis thaliana* genome, *Nucleic Acids Res.* 31: 4561- 4572.
- Ziegler J, Facchini P.J. 2008. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 59: 735-769.
- Zingman L.V, Alekseev A.E, Bienengraeber M, Hodgson D, Karger A.B, Dzeja P.P, Terzic A. 2001. Signaling in channel/enzyme multimers: ATPase transitions in SUR module gate ATP-sensitive K⁺ conductance. *Neuron.* 31:233-245.
- Zingman L.V, Hodgson D.M, Bienengraeber M, Karger A.B, Kathmann E.C, Alekseev A.E, Terzic A. 2002. Tandem function of nucleotide binding domains confers competence to sulfonylurea receptor in gating ATP-sensitive K⁺ channels. *J Biol Chem.* 277:14206-14210.