AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

École doctorale 410 Sciences et Ingénierie Ressources Procédés Produits Environnement
Unité Mixte de Recherche 1121 Université de Lorraine – INRA
Laboratoire Agronomie et Environnement, 2 avenue de la Forêt de Haye, TSA 40602,
54518 Vandœuvre-Lès-Nancy Cedex

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'université de Lorraine en sciences agronomiques

par

Audray DUGRAND-JUDEK

Contribution à l'étude phytochimique et moléculaire de la synthèse des coumarines et furocoumarines chez diverses variétés d'agrumes du genre *Citrus*

Thèse soutenue publiquement le 7 décembre 2015, devant un jury composé de :

Mme Danièle Werck-Reichhart (DR CNRS, Strasbourg)	Rapporteure
Mr. Laurent Urban (Professeur à l'université d'Avignon)	Rapporteur
Mr. Jean-Pierre Jacquot (Professeur à l'université de Lorraine)	Examinateur
Mme Hélène Bergès (IR INRA, Toulouse)	Examinatrice
Mr. Alain Hehn (Professeur à l'université de Lorraine)	Directeur de thèse
Mr. Frédéric Bourgaud (Professeur à l'université de Lorraine)	Co-directeur de thèse
Mr. Alexandre Olry (IR université de Lorraine)	Invité
Mr. Yann Froelicher (CR CIRAD, San Giuliano)	Invité

À papi Cel

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite vivement remercier Madame Danièle Werck-Reichhart, directrice de recherche à l'IBMP de Strasbourg et Monsieur Laurent Urban, professeur à l'université d'Avignon, pour le temps qu'ils ont consacré à juger mon travail de doctorat. Je remercie aussi Madame Hélène Bergès, directrice du CNRGV de Toulouse et Monsieur Jean-Pierre Jacquot, professeur à l'université de Lorraine, d'avoir accepté d'être les examinateurs de cette thèse.

J'aimerais exprimer toute ma reconnaissance à mes encadrants : au professeur Alain Hehn, mon directeur de thèse et au professeur Frédéric Bourgaud, mon co-directeur de thèse, pour m'avoir proposé ce passionnant sujet, ainsi qu'au docteur Alexandre Olry. Vous avez fait preuve d'une très grande disponibilité à mon égard et m'avez beaucoup encouragé au cours de ces trois dernières années. Un grand merci pour tout cela. Je vous remercie également pour votre expertise dans vos domaines de compétences respectifs, elle m'a été d'une aide précieuse et très enrichissante. Merci aussi de m'avoir permis de m'ouvrir à d'autres compétences, notamment en m'ayant laissé participer aux Doctoriales de Lorraine, ainsi qu'au concours régional « Ma thèse en 180 secondes ».

Alain, je crois pouvoir dire que tu es un grand pédagogue et à l'avenir, je m'efforcerai de garder cette ligne de conduite que je trouve formidable. Merci pour tous tes conseils avisés, que ce soit dans le domaine de la biologie moléculaire, pour la rédaction de ma thèse ou même pour mon avenir. À ce titre, je tiens à te remercier pour ta bienveillance et ta grande sollicitude à mon égard, tout au long de mon doctorat. Un grand merci aussi pour ton implication dans la vie du labo, qui grâce à toi paraît plus belle ! Mais au fait, où est Ducky ?!

Fred, je souhaite te remercier grandement pour ton professionnalisme, ainsi que pour tous tes bons conseils. Grâce à toi, j'ai beaucoup appris sur le domaine de la recherche et notamment sur le travail d'équipe et la rédaction d'articles, qui sont au cœur du métier de chercheur. Merci aussi d'avoir été là pour moi lorsque je me posais plein de questions sur mon avenir. J'ai maintenant les idées un peu plus claires. Je te remercie également pour ton enthousiasme, que j'apprécie beaucoup.

Alex, un grand merci à toi pour ton aide à la paillasse et pour ton expertise en enzymologie et tes bons conseils. Tu as toujours été là pour répondre à mes nombreuses questions et c'est pas peu dire ! Je te remercie aussi pour ta bonne humeur et pour tous ces petits intermèdes comiques avec Hugues, qui ajoutent un rayon de soleil dans le labo.

Je tiens également à remercier Christophe Robin pour son implication dans l'encadrement des doctorants au cours de leur thèse. Christophe, c'est grâce à l'exercice que tu nous proposes que j'ai saisi tout le sens de mon sujet de thèse. À partir de là, j'étais sur les rails ! Un grand merci à toi pour cette initiative, qui selon moi, doit vraiment être perpétuée pour les prochains doctorants.

Mon travail de thèse s'est déroulé en collaboration avec l'équipe de l'INRA/CIRAD de San Giuliano en Corse. J'y remercie Yann Froelicher et Patrick Ollitrault pour leur expertise dans le domaine de la génétique des agrumes. À Nancy, nous ne connaissons que la bergamote, et encore, elle n'y pousse pas ! Grâce à vous, j'ai beaucoup appris sur ces merveilleux fruits, qui ont fait l'objet de ma thèse. Merci aussi à Gilles Costantino pour son aide pour les analyses statistiques des résultats. Je tiens également à remercier Marie Durand, pour notre agréable collaboration au cours de nos thèses respectives. J'ai beaucoup apprécié travailler avec vous tous ces dernières années, vous apportez de la chaleur dans l'une des régions les plus froides de France ! J'espère un jour pouvoir moi aussi habiter en vacances :D

D'autres collaborations ont été effectuées au cours de mon travail de thèse. Je tiens donc aussi à remercier les docteurs Dave Ritchie et Bernard Maigret du LORIA de Nancy, pour leur aide en bioinformatique. Merci également au professeur Athanase Visvikis de l'IMoPA de Vandœuvre-Lès-Nancy, pour son expertise dans le domaine des ARN.

J'écrivais plus haut que la bergamote ne pousse pas à Nancy, mais ce n'est pas tout à fait vrai. Le jardin botanique du Montet à Villers-Lès-Nancy, possède une jolie petite collection de variétés d'agrumes bien soignées. Aussi, je remercie grandement l'équipe des serres tropicales : Aurélie Hubert, Marc Rémy et Aurélien Bour, de m'avoir permis de récolter les fruits de leur travail. Un grand merci en particulier à Aurélie pour son accueil chaleureux et pour la dégustation des « échantillons excédentaires ».

Je voudrais aussi remercier ici, des personnes que je n'ai pas eu l'occasion de voir souvent au cours de ma thèse, mais qui ont tout de même eu un rôle important pour moi. Je parle de tous les organisateurs des Doctoriales de Lorraine 2014 (Aude Mertens, Marc Dalaut, Marie-Pierre Knidel, Patrick Truchot, Benoît Roussel, Nathalie Hiesiger et Muriel Legrand) et du concours régional « Ma thèse en 180 secondes », édition 2014 (Nicolas Beck, Catherine Flauder, Chantal Puccio et Marc Guepratte). Parce que je suis convaincue que la thèse, ce n'est pas seulement un sujet à explorer… Pour ceux qui le veulent, c'est aussi un moyen d'apprendre à communiquer sa recherche au grand public, de s'ouvrir aux autres et à leur culture, de faire des rencontres et d'être créatif. J'ai appris tout cela en participant à ces événements qui ont été très enrichissants. Merci donc aux organisateurs ! Un merci particulier aux membres de mon équipe lors des Doctoriales, la F'Lib team (Mimi, Sabrina, Viktoriia, Lu, Romain, Faycel, Maxime, Nicolas, Kun et Philip), avec qui j'ai passé une excellente semaine à Ventron. C'est quand même pas tous les jours qu'on fabrique un réceptacle à œufs en carton !

J'aimerais maintenant remercier mes collègues du LAE, qui ont également joué un rôle dans ce travail de thèse. Merci à Thibault, Jérémy et Cédric pour leur aide avec les divers appareils du laboratoire commun d'analyses. Elles sont capricieuses ces machines, mais qu'est-ce qu'elles sont puissantes quand elles fonctionnent ! Je remercie également Jean, pour son aide pour les analyses statistiques de mes résultats. Merci aussi aux techniciens du labo : Julie, Aude et Joffrey, pour leurs réponses à mes diverses interrogations techniques. Un grand merci en particulier à Julie, qui m'a été d'un grand secours lors de mes dernières

expérimentations ! Julie, je te vois comme une tempête colorée pour le labo :) Merci aussi à toi Claude, pour m'avoir régulièrement aidé pour les points techniques à la serre ou aux phytotrons. Je remercie également Sandro, Romain, Corinna, Fazeelat, et Victoire, avec qui j'ai beaucoup échangé pendant mon travail de thèse. Sandro, merci pour toutes tes explications très pédagogiques et très intéressantes. J'ai été ravie de partager mon bureau avec toi pendant ma thèse ! Je remercie toute l'équipe d'organisation de la JJC 2015 : Léonor, Mariana, Caroline, Victoire, Hugues, Colin, Frédéric et Sandro, avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à organiser cet événement. Merci aussi aux autres membres de l'équipe AD du labo (Sylvain, Séverine, Sophie, Françoise, Nadia, Helmut, Alice, Christian, Aline et Abdellak), pour leur curiosité vis-à-vis des recherches de l'équipe Métabolites secondaires. Un grand merci également à mon voisin de bureau, le professeur émérite Armand Guckert, pour sa gentillesse et pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux.

Je tiens à remercier grandement Quentin Czerwiec, qui a été mon stagiaire pendant plusieurs mois et avec qui nous avons fait un très bon travail valorisé dans mon manuscrit !

A special thank to Ryousuke, who was very open-minded during his various stays in France, and with whom I could discover a bit of the Japanese culture. I hope to see you soon !

Je souhaite dire un GRAND merci à Thamara Olivier et à Christine Fivet, qui ont toujours répondu avec gentillesse à mes nombreuses questions d'ordre administratif. Décidément, les papiers à remplir et moi, ça fait bien deux ! Christine, merci beaucoup pour ta très bonne confiture cassis-groseille-bergamote. Tu ne pouvais pas trouver mieux pour une doctorante travaillant sur les agrumes !

J'en viens maintenant à vous les PAT Girls… (bien qu'il y ait aussi des garçons maintenant). Justinne, Léa, Léonor, Estelle, Sissi, Cindy, Léna, Adeline et Carole, ça fait beaucoup !! MERCI, MERCI, MERCI ! Vous m'avez accueillie à bras ouverts et m'avez clairement fait comprendre que j'étais moi aussi une PAT Girl… d'adoption ! J'en suis très heureuse et très fière ! Et puis, maintenant, je fais définitivement partie de la secte, puisque Momo vient de s'installer dans ma cuisine ! J'ai adoré tout ce temps passé avec vous à discuter dans les labos, la salle de pause, vos bureaux ou pendant nos pique-niques dehors en été. C'étaient mes petits moments d'évasion. Sans parler du superbe week-end que nous avons passé dans les Vosges, celui-là, il restera gravé dans ma mémoire ! Bref, je suis comblée d'être l'une des vôtres et d'avoir plein de souvenirs partagés avec vous… Et puis nous avons quand même eu quelques discussions sérieuses à propos du boulot de temps en temps ; alors merci aussi pour cette aide précieuse ! David, Alec, je ne vous oublie pas. Pardonnez-moi d'avance de vous intégrer dans le paragraphe « PAT Girls », mais comme vous êtes arrivés après… Merci à vous aussi pour votre bonne humeur dans les labos. C'était très agréable de travailler en votre compagnie !

Ma Juju, ma Léa, ma Marie, vous le savez, je ne fais plus trop la distinction amies-famille avec vous maintenant ! Faut croire qu'une semaine à faire le tour de la Corse à quatre dans une Clio, avec le coffre blindé et les vêtements trempés qui sèchent sur la plage arrière

de la voiture, ça change tout… Je suis plus qu'heureuse de tous les moments que nous avons partagés et que nous continuons de partager ensemble, ainsi qu'avec Alex, Tristan et Mathieu. J'aime à décrire la vie comme un tabouret à trois pieds : un pour la famille, un pour le travail et un pour les amis. Sans vous, mon tabouret ne serait plus très stable… Et sans mes amis du lycée non plus ! Je suis heureuse que vous ayez rencontré Pierre-Loup, Marine, Marie, Julien, Ludo et Yann et que vous nous ayez tous entouré d'amour le 8 août dernier. Merci à vous mes chers amis, pour tout ce bonheur partagé. Je ne m'en lasserai jamais ! Je vous aime très fort !

C'est au tour de ma famille et de ma belle-famille d'être grandement remerciées. Je vous l'ai dit lors d'une belle soirée d'été, il y a à peine deux mois : vous avez tous contribué à faire de moi la personne que je suis aujourd'hui. Vous ne cessez de m'entourer d'amour et de m'apporter de la joie, merci pour ça ! Je remercie en particulier mes quatre grands-parents qui sont toujours là pour moi. En écrivant ces mots, j'ai une pensée pour toi papi, qui était à ma place il y a de cela quelques années. Aujourd'hui, je suis fière de suivre ton chemin ! Un grand merci aussi à ma marraine qui n'est jamais très loin et qui est de très bon conseil. Ma soeurette, merci à toi pour l'amour inépuisable que tu me portes, il représente l'une de mes plus grandes richesses. Maman, papa, nous y voici. Ces mots marquent la fin d'une étape dans ma vie, celle de mes études. Ils ne seront jamais assez forts pour exprimer toute ma gratitude pour les sacrifices immenses que vous avez faits pour nous. Je sais que vous ne les regrettez pas une seule seconde. Alors encore une fois, merci pour votre amour, votre soutien et votre aide pour ma thèse ! Je vous aime tous très fort !

Pour finir, j'aimerais remercier la personne qui est à mes côtés depuis tant d'années sans broncher, malgré tous les obstacles que nous avons eu à passer. Clément, mon mari, je commence tout juste à comprendre l'effort qu'il faut fournir, pour supporter les études soutenues de son conjoint. Je te remercie donc grandement pour ta patience, ton implication, ton soutien sans faille et ton dévouement. Un grand merci aussi pour ton aide, notamment cette dernière année, car ce n'est pas tous les jours facile d'écrire sa thèse et de préparer un mariage en même temps ! J'essaierai d'être à la hauteur quand ton tour viendra, ce qui arrivera bien assez vite ! Tu le sais déjà, mais… je t'aime.

Encore une fois, merci à tous !
Audray Dugrand-Judek, octobre 2015

Sommaire

Remerciements **1**

Sommaire **5**

Liste des figures **9**

Liste des tableaux **12**

Liste des annexes **14**

Liste des abréviations **15**

Noms latins et vernaculaires des espèces citées **18**

Introduction générale **21**

Chapitre I : Synthèse bibliographique et objectifs de la thèse **25**

1. Présentation des coumarines et furocoumarines **25**

1.1 Structure des coumarines et furocoumarines 25

1.2 Distribution des coumarines et furocoumarines dans le règne végétal 26

1.3 Localisation des coumarines et furocoumarines au sein de la plante 26

1.4 Rôle physiologique des coumarines et furocoumarines dans la plante 27

1.5 Voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines 28

1.5.1 Synthèse des coumarines 28

1.5.2 Synthèse des furocoumarines à partir des coumarines 30

1.6 Propriétés physico-chimiques : cas des furocoumarines 33

1.6.1 Photooxydation et photolyse 33

1.6.2 Photoactivation et photocycloadditions 33

1.6.2.1 Sur l'ADN 33

1.6.2.2 Sur les protéines 34

1.6.2.3 Sur les acides gras 35

1.7 Utilisations thérapeutiques des coumarines et furocoumarines 36

1.7.1 Propriétés bénéfiques des coumarines pour l'homme 36

1.7.2 Propriétés bénéfiques des furocoumarines pour l'homme 36

1.7.2.1 La photochimiothérapie 36

1.7.2.2 Propriétés anticancéreuses des furocoumarines 37

1.8 Toxicité des coumarines et furocoumarines 38

1.8.1 Phototoxicité des coumarines et furocoumarines 38

1.8.2 Inhibition des cytochromes P450 par les furocoumarines 40

1.8.2.1 Découverte de l'effet pomelo 40

1.8.2.2 Furocoumarines impliquées dans l'effet pomelo 41

1.8.2.3 Lutte engagée contre l'effet pomelo 42

2. Présentation des agrumes, des plantes productrices de coumarines et furocoumarines **43**

2.1 Description botanique des agrumes 43

2.2 Origine et diffusion géographiques des agrumes 44

2.3 Diversité génétique des agrumes 46

2.3.1 Phylogénie et taxonomie 46

2.3.2 Origine génétique des espèces cultivées 47

2.4 Production, culture, récolte et utilisations des agrumes 48

2.4.1 Production d'agrumes dans le monde 48

2.4.2 Conditions de culture des agrumes 48

2.4.3 Récolte des fruits 49

2.4.4 Utilisations des agrumes 49

2.5 Production de coumarines et furocoumarines dans les agrumes 50

3. Présentation des cytochromes P450 ..... **51**

3.1 Généralités sur les cytochromes P450 51

3.2 Nomenclature des cytochromes P450 53
3.3 Diversification des cytochromes P450 53
3.4 Structure des cytochromes P450 55
3.5 Mécanisme réactionnel des cytochromes P450 58
3.5.1 Origine du pouvoir réducteur 58
3.5.2 Cycle catalytique 59
3.6 Rôles des cytochromes P450 60
3.6.1 Biosynthèse de composés naturels 60
3.6.2 Détoxification de composés exogènes 62
3.7 Cytochromes P450 et coumarines et furocoumarines 62
3.7.1 Inactivation autocatalytique des P450 par les furocoumarines 62
3.7.2 Détoxification de furocoumarines par des P450 et coévolution 63
4. Objectifs de la thèse 64

Chapitre II : Matériel et méthodes 67
1. Matériel utilisé 67
1.1 Matériel végétal : agrumes 67
1.2 Souches bactériennes 67
1.2.1 *E. coli* GeneHogs® 67
1.2.2 *E. coli* ccdB Survival™ 69
1.3 Souche de levure *Saccharomyces cerevisiæ* WAT11 69
1.4 Vecteurs de clonage 69
1.4.1 pCR®8/GW 69
1.4.2 pYeDP60_GW® 70
1.5 Milieux de culture 72
1.5.1 Milieux de culture de bactéries 72
1.5.1.1 Préparation du milieu Luria-Bertani 72
1.5.1.2 Préparation des antibiotiques 72
1.5.2 Milieux de culture de levures 73
1.5.2.1 Milieu YPGA 73
1.5.2.2 Milieu SGI 73
1.5.2.3 Milieu YPGE 73
1.5.2.4 Milieu YPL 73
2. Méthodes utilisées 74
2.1 Méthodes de biologie moléculaire 74
2.1.1 Extractions de l'ADN génomique de plantes 74
2.1.2 Extraction des ARN totaux d'agrumes 74
2.1.3 Synthèse d'ADNc par transcription inverse 76
2.1.4 Amplification de fragments d'ADN par PCR 76
2.1.4.1 Amplification classique 77
2.1.4.2 Amplification haute fidélité 78
2.1.5 Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose 79
2.1.6 Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose 80
2.1.7 Ligation d'un ADNc dans le vecteur pCR®8/GW 80
2.1.8 Transformation génétique de bactéries électrocompétentes 80
2.1.9 Sélection de colonies bactériennes correctement transformées 80
2.1.10 Purification de plasmides 81
2.1.11 Digestion de plasmides par des enzymes de restriction 82
2.1.12 Transfert d'un gène d'intérêt du pCR®8/GW vers le pYeDP60_GW® par LR-recombinaison 82
2.1.13 Quantification relative du niveau d'expression d'un gène par PCR quantitative 83
2.1.13.1 Méthode de quantification relative 83
2.1.13.2 Préparation des échantillons 84
2.1.13.3 Vérification de l'efficacité des PCR 85
2.1.13.4 Mélange réactionnel et programme de qPCR 85
2.2 Expression hétérologue d'un gène d'intérêt chez la levure 86
2.2.1 Préparation de levures compétentes 86
2.2.2 Transformation de levures compétentes 87
2.2.3 Système d'expression hétérologue de cytochromes P450 dans les levures 87
2.2.3.1 Conditions de culture 87

2.2.3.2 Préparation des microsomes ... 88
2.3 Méthodes d'analyse des protéines ... 89
2.3.1 Électrophorèse sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes ... 89
2.3.2 Transfert des protéines sur une membrane de polyfluorure de vinylidène ... 90
2.3.3 Western blot ... 90
2.4 Mesure d'activités enzymatiques ... 91
2.4.1 Criblage métabolique initial ... 91
2.4.2 Détermination des constantes cinétiques ... 92
2.4.3 Détermination du pH optimum d'activité ... 93
2.4.4 Détermination de la température optimale d'activité ... 93
2.5 Méthodes de biochimie ... 93
2.5.1 Extractions de phénylpropanoïdes ... 93
2.5.1.1 Échantillons d'agrumes ... 93
2.5.1.2 Échantillons de microsomes de levures ... 94
2.5.2 Analyses chromatographiques de composés ... 94
2.5.2.1 Analyses UPLC-MS des échantillons d'agrumes ... 94
2.5.2.2 Analyses HPLC-DAD des activités enzymatiques ... 96
2.5.2.3 Analyses LC-MS/MS des activités enzymatiques ... 96
2.6 Modélisation de CYP82D64 ... 97
2.7 Traitements statistiques des données ... 97

Chapitre III : Résultats et discussion ... 99
1. Partie I : Création, optimisation et validation d'une méthode d'analyse en UPLC-MS de 28 coumarines et furocoumarines dans des échantillons de peau et de pulpe d'agrumes ... 99
1.1 Création et optimisation de la méthode analytique en UPLC-MS avec des standards commerciaux ... 100
1.1.1 Séparation des composés en UPLC ... 100
1.1.2 Détection et quantification des composés en spectrométrie de masse ... 104
1.1.2.1 Détection ... 104
1.1.2.2 Quantification ... 105
1.2 Validation de la méthode analytique avec des standards commerciaux et des échantillons de peau d'agrumes ... 106
1.2.1 Paramètres indépendants des échantillons biologiques ... 106
1.2.2 Paramètres dépendants des échantillons biologiques ... 108
1.4 Publication n°1 ... 110
1.4 Validation de la méthode analytique avec des échantillons de pulpe d'agrumes ... 121
1.4.1 Paramètres de validation ... 121
1.4.2 Identification et quantification de coumarines et furocoumarines dans la pulpe d'agrumes ... 122
1.5 Discussion et conclusion ... 123
2. Partie II : Chémotypage de 62 variétés d'agrumes du genre *Citrus* pour l'identification d'espèces faiblement et fortement productrices de coumarines et furocoumarines ... 127
2.1 Chémotypage initial de 61 variétés d'agrumes du genre *Citrus* ... 127
2.1.1 Description du matériel végétal utilisé ... 127
2.1.2 Distribution générale des coumarines et furocoumarines chez les agrumes ... 128
2.1.2.1 Comparaison des tissus du fruit ... 128
2.1.2.2 Comparaison des variétés d'agrumes ... 131
2.1.3 Organisation de la diversité génétique des agrumes en fonction de la composition en coumarines et furocoumarines ... 132
2.1.3.1 Dans la peau ... 132
2.1.3.2 Dans la pulpe ... 133
2.2 Publication n°2 ... 136
2.3 Étude de dominance de la production de coumarines et furocoumarines chez les espèces secondaires d'agrumes ... 180
2.4 Chémotypage du tangelo Minneola (*Citrus paradisi* × *Citrus reticulata*) ... 181
2.5 Discussion ... 183
2.5.1 Répartition des coumarines et furocoumarines dans les tissus du fruit ... 183
2.5.2 Contre-sélection des coumarines et furocoumarines chez les agrumes ... 183
2.6 Conclusion ... 184

3. Partie III : Identification et caractérisation fonctionnelle de cytochromes P450 potentiellement impliqués dans la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes 187
3.1 Identification et caractérisation fonctionnelle de cytochromes P450 de la sous-famille CYP82D chez les *Citrus* 188
3.1.1 Clonage de séquences codantes et expression hétérologue dans la levure 188
3.1.1.1 Clonage de 2 séquences d'ADNc d'intérêt 188
3.1.1.2 Expression hétérologue des *CYP82D64* dans la levure 191
3.1.2 Caractérisation fonctionnelle des CYP82D64 *in vitro* 192
3.1.2.1 Criblage métabolique 192
3.1.2.2 Caractéristiques enzymatiques 195
3.1.3 Étude *in silico* des CYP82D64 203
3.1.3 Suivi de l'expression de *CYP82D64* de pomelo Ruby et de la production de coumarines et furocoumarines au cours de la maturation des fruits 206
3.1.3.1 Niveau d'expression de *CYP82D64* de pomelo Ruby 207
3.1.3.2 Production de coumarines et de furocoumarines chez le pomelo Ruby 209
3.2 Identification et étude de cytochromes P450 de la sous-famille CYP71CE chez les *Citrus* 213
3.2.1 Clonage des séquences codantes 213
3.2.2 Tentative d'expression hétérologue de *CYP71CE1* d'orange douce dans la levure 218
3.3 Identification de cytochromes P450 des sous-familles CYP82C et CYP71AN chez les Citrus 220
3.3.1 Clonage de *CYP82C46* 220
3.3.2 Clonage de *CYP71AN25* 222
3.4 Discussion 223
3.4.1 Étude comparative des *CYP82D64* de pomelo Ruby et de Combava 223
3.4.2 Évolution convergente des CYP82 et CYP71 225
3.4.3 Évolution de la synthèse de coumarines et furocoumarines au cours de la maturation du pomelo Ruby 228
3.4.4 *CYP71CE1* d'orange douce et de pomelo : un pseudogène 229
3.5 Conclusion 230
Conclusion générale et perspectives 233
Références bibliographiques 239
Annexes 253
Liste des publications 317

Liste des figures

Figure 1. Classes de métabolites secondaires et quelques exemples de leurs composés naturels. 23
Figure 2. Structure des différents types de coumarines de plantes supérieures. 25
Figure 3. Voie de biosynthèse simplifiée des coumarines. 29
Figure 4. Voie de biosynthèse simplifiée des furocoumarines. 31
Figure 5. Représentation schématique de la photocycloaddition de la xanthotoxine sur l'ADN double brin (Kitamura et al., 2005). 34
Figure 6. Mécanisme théorique de l'activation de la protéine kinase C par l'adduit xanthotoxine-acide gras déclenchant la mélanogénèse (Anthony *et al.*, 1997). 35
Figure 7. Amélioration de l'aspect visuel de la peau après un traitement UV chez des patients atteints de vitiligo (Sapam *et al.*, 2012). 37
Figure 8. Photophytodermatoses chez des patients ayant été en contact ou ayant ingéré des furocoumarines et s'étant exposés au soleil. 38
Figure 9. Métabolisation de la Félodipine par CYP3A4 suite à l'ingestion de jus de pomelo ou non (Bailey *et al.*, 1998). 41
Figure 10. Proposition de sites pouvant intervenir dans les interactions entre la bergamottine et CYP3A4 (Row *et al.*, 2006). 42
Figure 11. Planches illustratives de *Citrus sinensis* (oranger doux). 43
Figure 12. Origine géographique et dispersion des agrumes dans le monde. 45
Figure 13. Classification et phylogénie des agrumes (Jacquemond *et al.*, 2013). 47
Figure 14. Consommation apparente de pomelos et pamplemousses (en tonnes) entre 1961 et 2010. 51
Figure 15. Diversité des réactions catalysées par les cytochromes P450 (Sono *et al.*, 1996). 52
Figure 16. Différentes classes d'introns existantes. 54
Figure 17. Pseudogénisation liée à la duplication d'un gène (Podlaha and Zhang, 2001). 55
Figure 18. Structure d'un hème de cytochrome P450 (adapté de Groves, 2003). 56
Figure 19. Structure d'un cytochrome P450 (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). 57
Figure 20. Classification des cytochromes P450 en fonction de l'origine du pouvoir réducteur (Bernhardt, 2006). 59
Figure 21. Cycle catalytique des cytochromes P450 (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). 60
Figure 22. Représentation schématique du vecteur du kit pCR®8/GW/TOPO® TA cloning. 70
Figure 23. Représentation schématique du vecteur pYeDP60_GW®. 71
Figure 24. Schéma représentant l'insertion d'un gène d'intérêt dans le vecteur pCR®8/GW. 81
Figure 25. Représentation schématique de la LR-recombinaison d'un gène d'intérêt depuis le pCR®8/GW vers le pYeDP60_GW®. 83
Figure 26. Gradients d'élution testés pour la séparation des coumarines et furocoumarines en UPLC. 100
Figure 27. Spectres de masses d'un mélange de standards commerciaux après séparation en UPLC, suivant différents gradients d'élution. 103
Figure 28. Spectre de masse de la 5-hydroxy-xanthotoxine (composé n°28) après séparation en UPLC. 104

Figure 29. Composants du spectromètre de masse intervenant dans l'optimisation de la détection des composés à doser. 105
Figure 30. Concentration (mg/kg poids frais) des coumarines et furocoumarines dans les extraits de peau des 61 variétés d'agrumes initialement étudiées. 129
Figure 31. Concentration (mg/kg poids frais) des coumarines et furocoumarines dans les extraits de pulpe des 61 variétés d'agrumes initialement étudiées. 130
Figure 32. ACP représentant la distribution des 61 variétés d'agrumes en fonction de la présence/absence de 27 coumarines et furocoumarines dans leur peau. 134
Figure 33. ACP représentant la distribution des 61 variétés d'agrumes en fonction de la présence/absence de 27 coumarines et furocoumarines dans leur pulpe. 135
Figure 34. Concentration moyenne (mg/kg poids frais) des coumarines et furocoumarines dans les extraits de peau et de pulpe du tangelo Minneola et de ses deux ascendants, la mandarine Dancy et le pomelo Duncan. 182
Figure 35. Alignement des séquences protéiques déduites des séquences nucléotidiques des *CYP82D64* de clémentine (*Ciclev10025349*), de pomelo Ruby et de Combava. 190
Figure 36. Mise en évidence de la production des CYP82D64 chez la levure par Western-Blot. 191
Figure 37. Produit de métabolisation de la xanthotoxine par CYP82D64 de pomelo Ruby. 193
Figure 38. Produit de métabolisation de la xanthotoxine par CYP82D64 de Combava. 194
Figure 39. Produit de métabolisation de l'herniarine par CYP82D64 de Combava. 195
Figure 40. Détermination du pH optimal d'activité de CYP82D64 de pomelo Ruby en présence de xanthotoxine. 196
Figure 41. Détermination du pH optimal d'activité de CYP82D64 de Combava en présence de xanthotoxine. 197
Figure 42. Détermination du pH optimal d'activité de CYP82D64 de Combava en présence d'herniarine. 197
Figure 43. Détermination de la température optimale d'activité de CYP82D64 de pomelo Ruby en présence de xanthotoxine. 198
Figure 44. Détermination de la température optimale d'activité de CYP82D64 de Combava en présence de xanthotoxine. 199
Figure 45. Détermination de la température optimale d'activité de CYP82D64 de Combava en présence d'herniarine. 199
Figure 46. Accumulation de 5-hydroxy-xanthotoxine par CYP82D64 de pomelo Ruby en fonction du temps. 200
Figure 47. Accumulation de 5-hydroxy-xanthotoxine par CYP82D64 de Combava en fonction du temps. 201
Figure 48. Quantité de 5-hydroxy-xanthotoxine formée par CYP82D64 de pomelo Ruby en fonction de la concentration en xanthotoxine. 202
Figure 49. Quantité de 5-hydroxy-xanthotoxine formée par CYP82D64 de Combava en fonction de la concentration en xanthotoxine. 202
Figure 50. Alignement des structures primaires de CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava basé sur l'alignement de leurs structures 3D. 204
Figure 51. Modélisation des structures tridimensionnelles des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava avec leurs ligands. 205

Figure 52. Visualisation des interactions entre les CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava et leurs substrats au niveau du site actif des enzymes. 206
Figure 53. Fruits de pomelo Ruby à différents stades de maturité. 207
Figure 54. Quantification relative de *CYP82D64* de pomelo Ruby dans différents tissus du fruit à différents stades de maturité. 209
Figure 55. Concentration moyenne (mg/kg poids frais) des coumarines et furocoumarines dans différents tissus de fruits de pomelo Ruby à différents stades de maturité. 210
Figure 56. Concentration moyenne (mg/kg poids frais) en xanthotoxine dans différents tissus de fruits de pomelo Ruby à différents stades de maturité. 211
Figure 57. Concentrations moyennes (mg/kg de poids frais) en 5-hydroxy-xanthotoxine dans différents tissus et à différents stades de maturité de fruits de pomelo Ruby. 212
Figure 58. Vérification de l'absence de séquence d'ADNg du gène *CYP71CE1* dans les échantillons d'ARN d'orange douce et de pomelo Ruby. 214
Figure 59. Distribution des exons et des introns dans la séquence codante de *CYP71CE1* ... 214
Figure 60. Changement du cadre de lecture de *CYP71CE1* d'orange douce et de pomelo Ruby conduisant au raccourcissement de la protéine correspondante. 215
Figure 61. Vérification de l'épissage de l'intron 1 de *CYP71CE1* chez l'orange douce et le pomelo Ruby. 216
Figure 62. Vérification de l'épissage des introns de *CYP71CE1* chez l'orange douce et le pomelo Ruby. 218
Figure 63. Mise en évidence de l'absence de production de CYP71CE1 chez la levure par Western-Blot. 219
Figure 64. Mise en évidence de l'absence de production de CYP82C46 chez la levure par Western-Blot. 221
Figure 65. Amplification totale et partielle de la séquence génomique de *CYP71AN25* dans un échantillon d'ADNg de peau de pomelo Ruby. 223
Figure 66. Alignement des séquences protéiques des *CYP82* et *CYP71* déduites des séquences nucléotidiques. 227

Liste des tableaux

Tableau 1. Évaluation de la phototoxicité de diverses coumarines et furocoumarines. 39
Tableau 2. Liste des variétés d'agrumes utilisées. 68
Tableau 3. Amorces permettant le séquençage du pYeDP60_GW® en amont et en aval du gène sous-cloné. 72
Tableau 4 : Liste des antibiotiques utilisés. 72
Tableau 5. Composition des milieux de culture des levures pour 1 L. 74
Tableau 6. Conditions expérimentales choisies ou adaptées (en gras) pour une extraction optimale d'ARN totaux de divers tissus d'agrumes. 75
Tableau 7. Volume de NaOH nécessaire à l'ajustement du pH pour une extraction optimale d'ARN totaux de pulpe d'agrumes. 75
Tableau 8. Programmes de PCR utilisés pour les amplifications classiques. 77
Tableau 9. Programmes de PCR utilisés pour les amplifications haute fidélité. 79
Tableau 10. Composition des solutions utilisées pour la préparation de levures compétentes. 86
Tableau 11. Composition des solutions utilisées pour la préparation des microsomes de levures. 89
Tableau 12. Composition des gels de concentration et de résolution pour le SDS-PAGE. 90
Tableau 13. Composition des milieux d'incubations pour les tests d'activité des microsomes. 92
Tableau 14. Préparation du tampon phosphate de sodium (NaPi) à différents pH à une température de 25 °C. 93
Tableau 15. Caractéristiques de la 5-hydroxy-xanthotoxine ajoutée ultérieurement à la méthode UPLC-MS. 105
Tableau 16. Linéarité et justesse de la 5-hydroxy-xanthotoxine dosée par la méthode UPLC-MS. 107
Tableau 17. Limites de détection et de quantification de la 5-hydroxy-xanthotoxine dans la peau d'orange amère. 109
Tableau 18. Limites de détection et de quantification des coumarines et furocoumarines et spécificité de la méthode UPLC-MS pour l'étude d'extraits de pulpe d'agrumes. 122
Tableau 19. Concentration (mg/kg poids frais) des coumarines et furocoumarines dans un extrait de pulpe de lime de Tahiti. 123
Tableau 20. Amorces utilisées pour l'amplification de séquences codantes d'agrumes correspondant au *Ciclev10025349* de clémentine. 188
Tableau 21. Pourcentages d'identité et de similarité entre les séquences protéiques des CYP82D64 de *Citrus*. 189
Tableau 22. Constantes cinétiques des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava obtenues avec le logiciel Sigmaplot. 203
Tableau 23. Amorces utilisées pour la quantification relative de l'expression de *CYP82D64* de pomelo Ruby. 207
Tableau 24. Vérification de l'efficacité des amorces pour l'amplification des gènes *EF1* et *CYP82D64* de pomelo Ruby. 208

Tableau 25. Amorces utilisées pour l'amplification de séquences codantes d'agrumes correspondant au gène *CYP71CE1* d'orange douce. 213
Tableau 26. Amorces utilisées pour l'amplification de la séquence codante de *CYP71CE1* d'orange douce et de pomelo Ruby autour du premier intron. 215
Tableau 27. Amorces utilisées pour vérifier l'épissage des deux introns de l'ARNm de *CYP71CE1* à partir des ADNc d'orange douce et de pomelo Ruby. 217
Tableau 28. Amorces utilisées pour l'amplification de séquences codantes d'agrumes correspondant au *Ciclev10028201* de clémentine. 220
Tableau 29. Amorces utilisées pour l'amplification totale ou partielle du gène Ciclev10018132 chez différentes variétés d'agrumes. 222
Tableau 30. Pourcentages d'identité et de similarité entre les séquences protéiques des CYP82 et CYP71. 226

Liste des annexes

Annexe 1. Liste des médicaments interagissant avec le pomelo. 253
Annexe 2. Protocole de préparation de bactéries *E. coli* GeneHogs® électrocompétentes. 255
Annexe 3. Structures et caractéristiques des coumarines testées pour le criblage métabolique. 256
Annexe 4. Structures et caractéristiques des furocoumarines testées pour le criblage métabolique. 257
Annexe 5. Gamme étalon de 5-hydroxy-xanthotoxine utilisée lors de la caractérisation enzymatique de CYP82D64. 258
Annexe 6. Durand-Hulak, M., Dugrand, A., Duval, T., Bidel, L. P. R., Jay-Allemand, C., Froelicher, Y., Bourgaud, F. and Fanciullino, A.-L. (2015) Mapping the genetic and tissular diversity of 64 phenolic compounds in *Citrus* species using a UPLC–MS approach. *Ann. Bot.*, 115, 861-877. 259
Annexe 7. Munakata, R., Inoue, T., Koeduka, T., Karamat, F., Olry, A., Sugiyama, A., Takanashi, K., Dugrand, A., Froelicher, Y., Tanaka, R., Uto, Y., Hori, H., Azuma, J.-I., Hehn, A., Bourgaud, F. and Yazaki, K. (2014) Molecular cloning and characterization of a geranyl diphosphate-specific aromatic prenyltransferase from lemon. *Plant Physiol.*, 166, 80-90. 282
Annexe 8. Étude de dominance de la production de coumarines et furocoumarines chez les espèces secondaires de *Citrus*. 308
Annexe 9. Concentration (mg/kg poids frais ± écart-type) des coumarines et furocoumarines dans les extraits de peau et de pulpe de tangelo Minneola. 311
Annexe 10. Séquences nucléotidiques codantes complètes des *CYP82D64* clonés chez le pomelo Ruby (*C. paradisi*) et chez le Combava (*C. hystrix*). 312
Annexe 11. Concentration (mg/kg poids frais ± écart-type) des coumarines et furocoumarines dans les extraits de flavédo, d'albédo et de pulpe de pomelo Ruby à différents stades de maturité. 313
Annexe 12. Séquences nucléotidiques codantes complètes des *CYP71CE1* clonés chez l'orange douce (*C. sinensis*) et le pomelo Ruby (*C. paradisi*). 314
Annexe 13. Séquence nucléotidique codante complète de *CYP82C46* clonée chez l'orange amère ou bigarade (*C. aurantium*). 315
Annexe 14. Pourcentages d'identité et de similarité entre les séquences protéiques des CYP82C46 et CYP82D64 de *Citrus*. 316

Liste des abréviations

3D : tridimensionnel
4CL : 4-coumarate-CoA ligase
5-MOP : 5-méthoxypsoralène (bergaptène)
8-MOP : 8-méthoxypsoralène (xanthotoxine)
ACP : analyses en composantes principales
AGAP : Unité Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales
ANOVA : analysis of variance (analyse de la variance)
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
APCI : atmospheric pressure chemical ionization (ionisation chimique à pression atmosphérique)
AS : angélicine synthase
B8M : bergaptène-8-monooxygénase
BCIP : 5-bromo-4-chloro-3-indole-phosphate
BET : bromure d'éthidium
BLAST : basic local alignment search tool (outil de recherche basique d'alignement local)
C2'H : *p*-coumaroyl-CoA 2'-hydroxylase
C2H : acide cinnamique 2-hydroxylase
C4H : acide cinnamique 4-hydroxylase
Cas 9 : CRISPR associated protein 9 (protéine 9 associée au CRISPR)
CIRAD : Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CN : chimiothèque nationale
CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique
CNUCED : Conférence des Nations Unies sur le Commerce et le Développement
CoA : coenzyme A
CPR : cytochrome P450 réductase
CRISPR : clustered regularly interspaced short palindromic repeats (courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées)
CS : columbianétine synthase
CYP : cytochrome P450
DAD : diode array detector (détecteur à barettes de diodes)
DEPC : pyrocarbonate d'éthyle
DL : desolvatation line (ligne de désolvatation)
DMAPP : diméthylallyl diphosphate
DMSO : diméthylsulfoxyde
dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate
DO : densité optique
DOX : 1-déoxy-D-xylulose
DTT : dithiothréitol
DUIS : dual ion source (source d'ionisation double)

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique
ENSAIA : École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
ESI : electrospray ionization (ionisation par électrospray)
FAD : flavine adénine dinucléotide
FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture)
FB : formule brute
FDA : Food and Drug Administration (Agence Américaine des Produits Alimentaires et Médicamenteux)
FdR : ferrodoxine réductase
Fdx : ferrédoxine
FMN : flavine mononucléotide
FW : fresh weight (poids frais)
GPP : géranyl diphosphate
GW : Gateway
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
ISSR : inter-simple sequence repeat (région entre SSR)
LAE : Laboratoire Agronomie et Environnement
LB : Luria-Bertani
LOD : limit of detection (limite de détection)
LOQ : limit of quantitation (limite de quantification)
LORIA : Laboratoire Lorrain de Recherche en Informatique et ses Applications
M : monooxygénase
MIB : mechanism-based inactivator (inhibiteur autocatalytique)
MS : marmésine synthase
MS : mass spectrometry (spectrométrie de masse)
MS/MS : spectrométrie de masse en tandem
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaPi : phosphate de sodium
NBT : 4-nitroblue tétrazolium chloride
nt : nucléotide
O-MT : *O*-méthyltransférase
P-UVA : psoralène-UVA thérapie
P5M : psoralène-5-monooxygénase
P8M : psoralène-8-monooxygénase
PAL : phénylalanine ammonia-lyase
pb : paire de bases
PCR : polymerase chain reaction (réaction en chaîne par polymérase)
PDB : protein data bank (banque de données de protéines)
PKC : protéine kinase C
PLA_2 : phospholipase A_2
PM : poids moléculaire
PPO : polyphénol oxydase

PS : psoralène synthase
PT : prényltransférase
PVDF : polyfluorure de vinylidène
qPCR : PCR quantitative
RAPD : random amplified polymorphic DNA (amplification aléatoire d'ADN polymorphe)
RFLP : restriction fragment length polymorphism (polymorphisme de longueur des fragments de restriction)
S/N : signal/noise (signal/bruit)
SCAR : sequenced characterized amplified region (séquence caractérisée d'une région amplifiée)
SDS : dodécylsulfate de sodium
SIM : selected ion monitoring (détection d'ion sélectionné)
SRS : substrate recognition site (site de reconnaissance du substrat)
SSR : simple sequence repeat (répétition de séquence simple)
TAE : Tris – Acétate – EDTA
TAL : tyrosine ammonia-lyase
TE : Tris – EDTA
Tm : température de fusion
UPLC : ultra high performance liquid chromatography (chromatographie liquide à très haute performance)
UV : ultraviolet
X5M : xanthotoxine-5-monooxygénase

Noms latins et vernaculaires des espèces citées

Plantes :

Amaranthus hypochondriacus : amarante hypocondriaque
Ammi majus : Queen Anne's Lace
Angelica dahurica
Apium graveolens : céleri
Arabidopsis thaliana : arabette des dames
Bougainvillea spectabilis : bougainvillée remarquable
Capsicum annuum : piment de Cayenne
Cinnamomum zeylanicum : cannelier de Ceylan
Citrus aurantifolia : limettier
Citrus aurantium : oranger amer ou bigaradier
Citrus bergamia : bergamotier (classification de Tanaka)
Citrus clementina : clémentinier (classification de Tanaka)
Citrus halimii : Mountain
Citrus hystrix : Combava
Citrus ichangensis : papeda Ichang
Citrus jambhiri : citronnier acide (classification de Tanaka)
Citrus junos : Yuzu (classification de Tanaka)
Citrus latifolia : limettier (classification de Tanaka)
Citrus latipes : Khasi
Citrus limon : citronnier
Citrus maxima : pamplemoussier
Citrus medica : cédratier
Citrus micrantha : papeda
Citrus paradisi : pomelo
Citrus reticulata : mandarinier
Citrus reticulata × *Citrus paradisi* : tangelo
Citrus reticulata × *Citrus sinensis* : tangor
Citrus sinensis : oranger doux
Daucus carota : carotte
Dianthus caryophyllus : œillet commun
Dipteryx odorata : coumarou
Dorstenia gigas : figuier de Socotra
Ficus carica : figuier commun
Helianthus annuus : tournesol
Helianthus tuberosus : topinambour
Ipomœa batatas : patate douce
Lactuca sativa : laitue cultivée
Lavandula angustifolia : lavande officinale
Murraya alata

Nicotiana benthamiana : tabac
Parthenium argentatum : guayule
Pastinaca sativa : panais
Petroselinum crispum : persil
Pisum sativum : pois cultivé
Psoralea corylifolia
Ruta graveolens : rue officinale
Selaginella moellendorfii
Solanum lycopersicum : tomate
Vaccinium myrtillus : myrtille commune
Vitis vinifera : raisin
Weigela florida : weigélie fleurie

Bactéries et champignons :

Bacillus megaterium
Candidatus liberibacter asiaticum : bactérie responsable de la maladie du dragon jaune (ou huanglongbing)
Candidatus liberibacter africanum : bactérie responsable de la maladie du dragon jaune (ou huanglongbing)
Escherichia coli : colibacille
Penicillium digitatum : champignon responsable de la pourriture des fruits (notamment des agrumes)
Puccinia helianthi : champignon responsable de la rouille du tournesol
Saccharomyces cerevisiæ : levure de boulanger

Insectes :

Coptotermes formosanus : coptoterme de Formose
Crypsiptya coclesalis
Depressaria pastinacella : mite du panais
Drosophila melanogaster : mouche du vinaigre
Papilio polyxenes : papillon du céleri
Zygaena larva

Introduction générale

Introduction générale

Au cours de leur développement, les plantes peuvent être soumises à des agressions diverses. Les facteurs abiotiques liés aux phénomènes météorologiques et au climat (orages, vent, neige, sécheresse...) et les facteurs biotiques (virus, bactéries, champignons, animaux et autres plantes) représentent de véritables menaces pour la survie des plantes. Ces dernières possèdent divers systèmes de défense pour faire face à ces stress. Par exemple, les tissus externes des plantes sont composés de couches lipidiques comme la cutine pour les parties aériennes et la subérine pour les parties souterraines, assurant une protection contre les attaques et les déperditions d'eau (Raven *et al.*, 2007). Certaines plantes possèdent aussi une écorce ou des épines les protégeant contre les animaux herbivores. Malgré ces moyens de protection passifs, les plantes restent vulnérables et font l'objet d'attaques par divers aggresseurs. Les plus petits (virus, bactéries et champignons) peuvent pénétrer dans la plante à l'occasion de blessures mécaniques. Certains champignons utilisent des « ouvertures » naturelles et parviennent à franchir l'épiderme de la plante par les stomates, lors de la germination des spores (Raven *et al.*, 2007). Les animaux herbivores, eux, peuvent se nourrir des feuilles menaçant alors fortement la survie des plantes.

Pour se protéger, en plus des barrières physiques, les plantes ont élaboré des systèmes de défense basés sur la production de molécules plus ou moins toxiques. Ces composés naturels sont issus du métabolisme de la plante et sont appelés métabolites secondaires ou encore métabolites spécialisés. Ils ont été évoqués pour la première fois en tant que « endproduckt » par Czapek qui considérait qu'ils provenaient du métabolisme de l'azote suite à des « modifications secondaires » (Czapek, 1921). Par la suite, dans les années quatre-vingt, ils étaient définis de la manière suivante : « produits naturels, généralement d'origine végétale, qui n'interviennent pas directement dans les activités biochimiques primaires permettant la croissance, le développement et la reproduction de l'organisme dans lequel ils sont produits » (Conn et Stumpf, 1981). Si à l'origine le terme de « métabolite secondaire » provenait d'une incompréhension de leur rôle au sein de la plante, du fait que leur synthèse varie énormément d'une plante à l'autre et du fait que ces molécules sont rarement remobilisées après leur accumulation (Macheix *et al.*, 2005), actuellement de nombreuses recherches montrent leurs rôles fondamentaux au cours du développement des plantes. De fait, nous parlons aujourd'hui de plus en plus de « métabolisme spécialisé ».

Les métabolites spécialisés peuvent être classés en quatre groupes principaux (figure 1) : les terpénoïdes, les alcaloïdes, les hétérosides et les composés phénoliques (Hopkins, 2003).

Les terpénoïdes appartiennent à la classe des hydrocarbures et possèdent une ou plusieurs unités isoprène à cinq atomes de carbone. Il existe une très grande diversité de terpènes possédant des structures plus ou moins complexes et présentant différents rôles au sein de la plante. Nous trouvons par exemple les caroténoïdes comme le β-carotène (Rodriguez-Concepcion et Stange, 2013), certaines phytohormones comme l'acide abscissique (Mehrotra *et al.*, 2014), les stérols comme le cholestérol (Pronin *et al.*, 2014) et leurs dérivés ou encore les composés terpéniques volatiles comme le limonène, présents dans les essences d'agrumes (Sun, 2007).

Les alcaloïdes sont des molécules généralement hétérocyliques, présentant au moins un atome d'azote souvent lié à un proton, ce qui leur confère un pH légèrement basique en solution, d'où leur nom d'alcaloïde (Hopkins, 2003). Contrairement aux autres métabolites secondaires, les alcaloïdes forment une classe de composés très hétérogènes pouvant être divisés en quatre groupes : les alcaloïdes dérivant d'acides aminés (ex : nicotine), ceux dérivant de la purine (ex : caféine), ceux dérivant des terpènes (ex : solanine) et les alcaloïdes dont l'azote se trouve dans un groupement polycétide comme pour la conine (Roberts et Wink, 1998). Certaines de ces molécules permettent à la plante de se défendre contre les insectes, les bactéries et les virus (pour revue, voir Qiu *et al.*, 2014) et il semblerait que l'amertume de la plupart des alcaloïdes ait un rôle dissuasif sur les herbivores (Roberts et Wink, 1998). Par ailleurs, certains alcaloïdes sont des drogues pouvant parfois avoir des usages thérapeutiques pour l'homme comme la morphine ou la codéine (Yu *et al.*, 2014).

Les hétérosides sont des molécules issues de la condensation d'un sucre avec une molécule non glucidique au niveau d'un atome de carbone, d'oxygène, de soufre ou d'azote. Il en existe différentes familles comme par exemple les saponosides (triterpènes glycosylés), les hétérosides cardiotoniques (différenciés des saponosides par la présence d'un cycle lactone et de glucides rares) et les hétérosides cyanogènes qui une fois hydrolysés, libèrent de l'acide cyanhydrique toxique (Hopkins, 2003). Les glucosinolates étaient autrefois apparentés à des hétérosides soufrés, du fait de leur structure similaire aux hétérosides. Ils sont largement reportés chez les Brassicacées, mais il existe néanmoins d'autres familles de plantes capables d'en produire (Fahey *et al.*, 2001). Dans l'ensemble, les hétérosides permettent à la plante de se défendre contre les herbivores, grâce à des propriétés répulsives et une plus ou moins grande toxicité.

Les composés phénoliques, aussi appelés polyphénols ou dérivés phénylpropanoïdes, possèdent une structure de base composée d'un cycle aromatique benzène hydroxylé : le phénol. Il existe une très grande diversité de polyphénols présentant des structures et des rôles différents. Il peut s'agir de molécules complexes, comme la lignine intervenant dans la structure de la plante, ou de molécules plus simples, impliquées dans les interactions avec l'environnement. Par exemple, les flavonoïdes interviennent dans la protection contre les ultraviolets (UV) et dans l'attraction des pollinisateurs grâce aux pigments anthocyaniques (Wang *et al.*, 2013). D'autres composés phénoliques sont synthétisés pour la protection de la plante contre les agresseurs comme par exemple les stilbènes (Adrian et Jeandet, 2012), les coumarines et les furocoumarines (Bourgaud *et al.*, 2006). Ce sont ces deux dernières classes de composés sur lesquelles je me suis penchée au cours des trois dernières années pour mon doctorat.

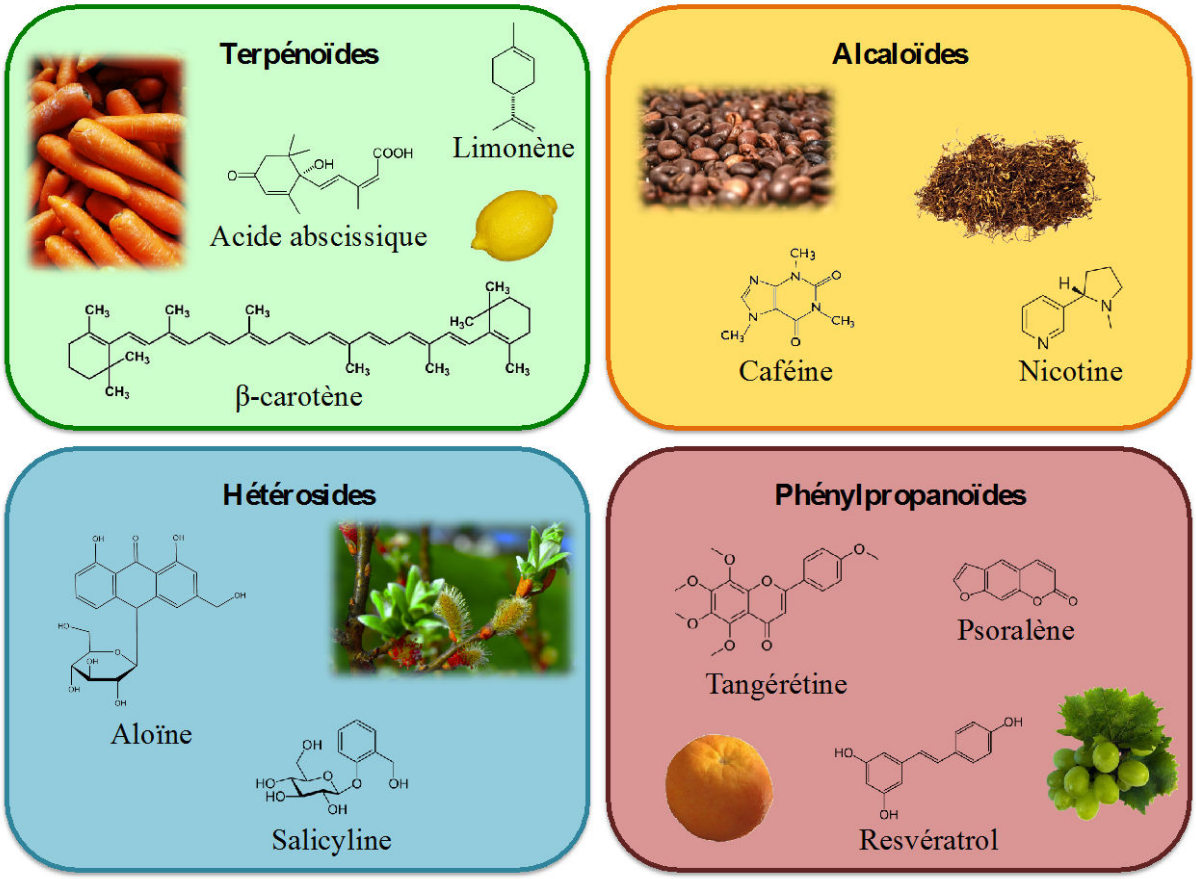


Figure 1. Classes de métabolites secondaires et quelques exemples de leurs composés naturels.

Chapitre I : Synthèse bibliographique et objectifs de la thèse

Chapitre I : Synthèse bibliographique et objectifs de la thèse

1. Présentation des coumarines et furocoumarines

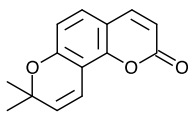
1.1 Structure des coumarines et furocoumarines

Les coumarines présentent toutes une structure composée d'un cycle benzène et d'un noyau lactone (benzo-α-pyrone) formant alors un noyau coumarine simple. À ce noyau peuvent s'ajouter différents groupements chimiques à l'origine de quatre types de coumarines différentes (figure 2) rencontrées chez les plantes supérieures (Bourgaud *et al.*, 2006) :

1. Les coumarines simples (benzo-α-pyrones) ;
2. Les furocoumarines (furobenzo-α-pyrones) qui résultent de la fusion d'un cycle furane en position 6 et 7 (furocoumarines linéaires) ou en position 7 et 8 (furocoumarines angulaires) sur un noyau coumarine simple ;
3. Les pyranocoumarines (benzodipyran-2-ones) qui résultent de la fusion d'un cycle pyrane sur un noyau coumarine simple, formant alors aussi des pyranocoumarines linéaires et angulaires ;
4. Les phénylcoumarines (benzo-benzo-pyrones) qui résultent de la fusion d'un cycle phényl sur un noyau coumarine simple et sont issues du métabolisme de l'isoflavone, contrairement aux autres coumarines qui dérivent toutes de la même voie de biosynthèse.

La grande diversité des coumarines résulte dans l'ajout de groupements chimiques à ces quatre structures de base, telles que des hydroxylations, des méthoxylations, des prénylations, des géranylations ou encore des époxydations, comme nous le verrons plus tard.

ndine : R6 = OCH_3
Pimpinelline : R5, R6 = OCH_3



Pyranocoumarines angulaires

Séseline

Figure 2. Structure des différents types de coumarines de plantes supérieures.

1.2 Distribution des coumarines et furocoumarines dans le règne végétal

Aujourd'hui, on recense plus de 1300 coumarines différentes (Iranshahi *et al.*, 2009) décrites chez les plantes, mais aussi chez les champignons et les bactéries. À l'origine, elles ont été découvertes dans la fève de tonka (*Dipteryx odorata*, famille des Fabacées) qui en contient beaucoup. Des coumarines ont été répertoriées chez près de 30 familles de plantes différentes comprenant environ 150 espèces et dont les plus importantes sont : les Rutacées (ex : agrumes, rue officinale), les Apiacées (ex : persil, panais, carotte), les Clusiacées (ex : genre *Calophyllum*), les Caprifoliacées (ex : *Weigela florida*), les Oléacées (ex : genre *Fraxinus*), les Nyctaginacées (ex : *Bougainvillea spectabilis*) (pour revue, voir Venugopala *et al.*, 2013). D'autres familles de plantes produisent aussi des coumarines comme les Lamiacées (ex : lavande) (Brown, 1963) et les Lauracées (ex : cannelle) (Miller *et al.*, 1996).

Les furocoumarines sont moins répandues que les coumarines simples. Quatre familles de plantes sont bien connues pour en produire : les Apiacées, les Moracées (ex : figuier), les Rutacées et les Fabacées (genres *Psoralea* et *Coronilla* uniquement) (Bourgaud *et al.*, 2006). Mais il en existe d'autres, telles que les Astéracées, les Rosacées, les Solanacées, les Pittosporacées, les Thyméléacées (Seigler, 1998), ou encore les Chénopodiacées (Miftakhova *et al.*, 2001). Les furocoumarines angulaires sont moins répandues que les linéaires. En effet, elles sont principalement présentes chez les Apiacées et les Fabacées (Bourgaud *et al.*, 1989) et dans une moindre mesure chez les Moracées, pour lesquelles une étude récente a permis d'isoler des furocoumarines angulaires chez *Dorstenia gigas* (Heinke *et al.*, 2012). Quant aux Rutacées et à la plupart des Moracées, elles ne produisent que des furocoumarines linéaires plus ou moins complexes.

1.3 Localisation des coumarines et furocoumarines au sein de la plante

Les coumarines et furocoumarines sont présentes dans toute la plante, mais certains compartiments en contiennent plus que d'autres. Les organes ou tissus comportant le plus de composés sont : les fruits (ex : myrtille, Venugopala *et al.*, 2013 ; agrumes, Chen *et al.*, 2011), les graines (ex : fève tonka, Spino *et al.*, 1998 ; graines de psoralée, Jan *et al.*, 2012), les racines (ex : racines d'angélique, Zheng *et al.*, 2010 ; Kim *et al.*, 2014 et les feuilles (ex : feuilles de pois Barilli *et al.*, 2015 ; feuilles d'angélique Kim *et al.*, 2014). Les huiles essentielles obtenues à partir de tissus de plantes peuvent contenir de grandes quantités de coumarines et furocoumarines (ex : cannelle Yeh *et al.*, 2014 ; agrumes, Dugo *et al.*, 2004 ; Dugo *et al.*, 2009). Chez les agrumes, ces huiles essentielles sont obtenues par pressage à froid de la peau des fruits, qui contient des glandes schizolysigènes sécrétant ces molécules (Voo *et al.*, 2012).

La plupart de ces tissus ou organes fortement producteurs de coumarines et furocoumarines sont ceux exposés aux prédateurs (ex : feuilles, racines) ou voués à la survie de l'espèce (ex : fruits contenant les graines). Mais la localisation des coumarines et furocoumarines au sein des plantes est aussi soumise aux conditions environnementales et peut donc varier au cours du temps (Venugopala *et al.*, 2013).

Les coumarines et furocoumarines pouvant être toxiques pour la cellule, elles sont stockées ou excrétées de sorte qu'elles ne perturbent pas le fonctionnement cellulaire. Par exemple, les Rutacées possèdent des glycosyl-transférases qui glycosylent les furocoumarines cytosoliques qui sont ensuite stockées dans la vacuole (Taguchi *et al.*, 2000). Cette glycosylation permet d'inhiber la toxicité de ces molécules (Jones et Vogt, 2001) de façon provisoire. Lors d'une attaque par un insecte, les blessures occasionnées permettent la libération des furocoumarines glycosylées de la vacuole qui sont ensuite remobilisées en formes aglycones par les β-glycosidases du cytosol (Wittstock et Gershenzon, 2002). Ainsi, les furocoumarines activées sont au contact direct avec l'agresseur. Les plantes peuvent aussi excréter les coumarines et furocoumarines toxiques à la surface de certains organes comme par exemple les feuilles (Zobel *et al.*, 1991). Chez le tournesol, un traitement à l'acibenzolar-S-méthyl (fongicide) induit une plus forte excrétion de coumarines (surtout de scopolétine) à la surface des feuilles, ce qui induit une résistance au champignon *Puccinia helianthi*, responsable de la rouille chez cette plante (Prats *et al.*, 2002).

1.4 Rôle physiologique des coumarines et furocoumarines dans la plante

Le principal rôle physiologique des coumarines et furocoumarines décrit à l'heure actuelle, réside dans la défense de la plante contre les attaques par des pathogènes ; on les qualifie de phytoalexines (Beier et Oertli, 1983). Les pathogènes en question peuvent être assez diversifiés, comme par exemple :

- les champignons : des extraits de *Citrus jambhiri* contenant des furocoumarines combinés à des UVB présentent une phototoxicité pour des champignons (Asthana *et al.*, 1993) ; l'osthol, une coumarine prénylée, présente une toxicité pour le mildiou (Wang *et al.*, 2009) ;
- les bactéries : certaines coumarines comme l'umbelliférone empêchent la formation de biofilms bactériens (Lee *et al.*, 2014) ; certaines furocoumarines sont toxiques pour les bactéries (Widelski *et al.*, 2009 ; Razavi et Zarrini, 2010) et en particulier les furocoumarines prénylées dont la lipophilicité facilite le passage à travers les membranes bactériennes (Stavri et Gibbons, 2005) ;
- les insectes : certaines coumarines repoussent et sont même toxiques pour les termites (Adfa *et al.*, 2010) ou pour les insectes de forêt *Crypsiptya coclesalis* (Sharma *et al.*, 2006) ; certaines furocoumarines comme l'isopimpinelline et la xanthotoxine sont toxiques pour les larves de drosophiles (Miyazawa *et al.*, 2004).

Par ailleurs, certaines furocoumarines sont des composés allélopathiques ayant la capacité d'inhiber la germination des plantes environnantes, comme l'aviprin qui inhibe la germination de la laitue (Razavi et Zarrini, 2010) ou l'ammirine qui inhibe celle de l'amarante (Anaya *et al.*, 2005).

Pour se défendre contre ces divers pathogènes, les plantes peuvent synthétiser des coumarines et furocoumarines aussi bien de manière constitutive que suite à une induction. Par exemple, une infection par *Penicillium digitatum* induit chez l'orange une augmentation de la synthèse de certains phénylpropanoïdes et en particulier de scoparone (Ballester *et al.*, 2013). Chez *Pastinaca sativa*, la simulation d'une attaque par des insectes induit la synthèse

de furocoumarines (Zangerl et Berenbaum, 1998). Les plantes ou organes étant fréquemment attaqués sont généralement protégés par une synthèse constitutive de composés défensifs, tandis que les autres mettent plutôt en place des défenses inductibles (Wittstock et Gershenzon, 2002). C'est le cas du panais dont les organes reproducteurs contiennent de façon constitutive de grandes quantités de xanthotoxine qui n'augmentent pas lors d'un stimulus. En revanche, les racines de cette plante qui contiennent peu de xanthotoxine sont hautement inductibles lors d'une attaque (Zangerl et Rutledge, 1996).

1.5 Voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines

1.5.1 Synthèse des coumarines

Les composés phénoliques sont synthétisés à partir des trois acides aminés aromatiques : la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Ces derniers sont eux-mêmes issus de la voie du shikimate dont les précurseurs sont l'érythrose-4-phosphate et le phosphoénolpyruvate provenant respectivement de la voie des pentoses phosphates et de la glycolyse (Hopkins, 2003). Dans le cas des coumarines et furocoumarines, elles dérivent de la phénylalanine (figure 3) qui est d'abord convertie en acide cinnamique par l'élimination d'une molécule d'ammoniac (NH_3), catalysée par la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) (Koukol et Conn, 1961). Une étude récente visant à produire des coumarines chez *Escherichia coli* a montré que ces molécules peuvent aussi dériver de la tyrosine (figure 3). Cette dernière peut être convertie en acide *p*-coumarique, par la tyrosine ammonia-lyase (TAL), qui catalyse également l'élimination d'une molécule d'ammoniac (Yang *et al.*, 2015).

Suite à l'action de la PAL, l'acide cinnamique peut être *ortho*-hydroxylé pour mener vers la coumarine ou *para*-hydroxylé pour aboutir à l'umbelliférone et aux furocoumarines. L'*ortho*-hydroxylation de l'acide cinnamique par l'acide cinnamique 2-hydroxylase (C2H), n'a pas encore été caractérisée d'un point de vue moléculaire à ce jour. Cette étape mènerait à l'acide *o*-coumarique (figure 3), qui en conditions neutres ou acides est instable et se lactonise de façon spontanée pour donner la coumarine (Bourgaud *et al.*, 2006). La *para*-hydroxylation de l'acide cinnamique aboutit à l'acide *p*-coumarique. Cette étape est effectuée par l'acide cinnamique 4-hydroxylase (C4H), un cytochrome P450 de la famille CYP73A initialement identifié chez le topinambour (Teutsch *et al.*, 1993), puis chez des dizaines d'autres plantes (Nelson, 2015) dont *Ruta graveolens* (Gravot *et al.*, 2004).

L'acide *p*-coumarique est ensuite converti en *p*-coumaroyl-CoA (figure 3) par l'action de la 4-coumarate-CoA ligase (4CL) (Costa *et al.*, 2005). De nombreux métabolites secondaires dérivent du *p*-coumaroyl-CoA, comme par exemple les coumarines et furocoumarines (Bourgaud *et al.*, 2006), les flavonoïdes (Kaneko *et al.*, 2003), les monolignols (Lin *et al.*, 2015) ou encore les stilbènes (Eckermann *et al.*, 2003). Le *p*-coumaroyl-CoA est ensuite converti en 2',4'-dihydroxycinnamoyl-CoA (figure 3) par une hydroxylation effectuée par une dioxygénase oxoglutarate dépendante (*p*-coumaroyl-CoA 2'-hydroxylase, C2'H) qui a été identifiée chez *Ipomœa batatas* (Matsumoto *et al.*, 2012) et chez *R. graveolens* dans notre laboratoire (Vialart *et al.*, 2012). Cette enzyme permet aussi la formation de scopolétine à partir du féruloyl-CoA. Le 2',4'-dihydroxycinnamoyl-CoA subit ensuite une lactonisation spontanée pour former l'umbelliférone (Bourgaud *et al.*, 2006).

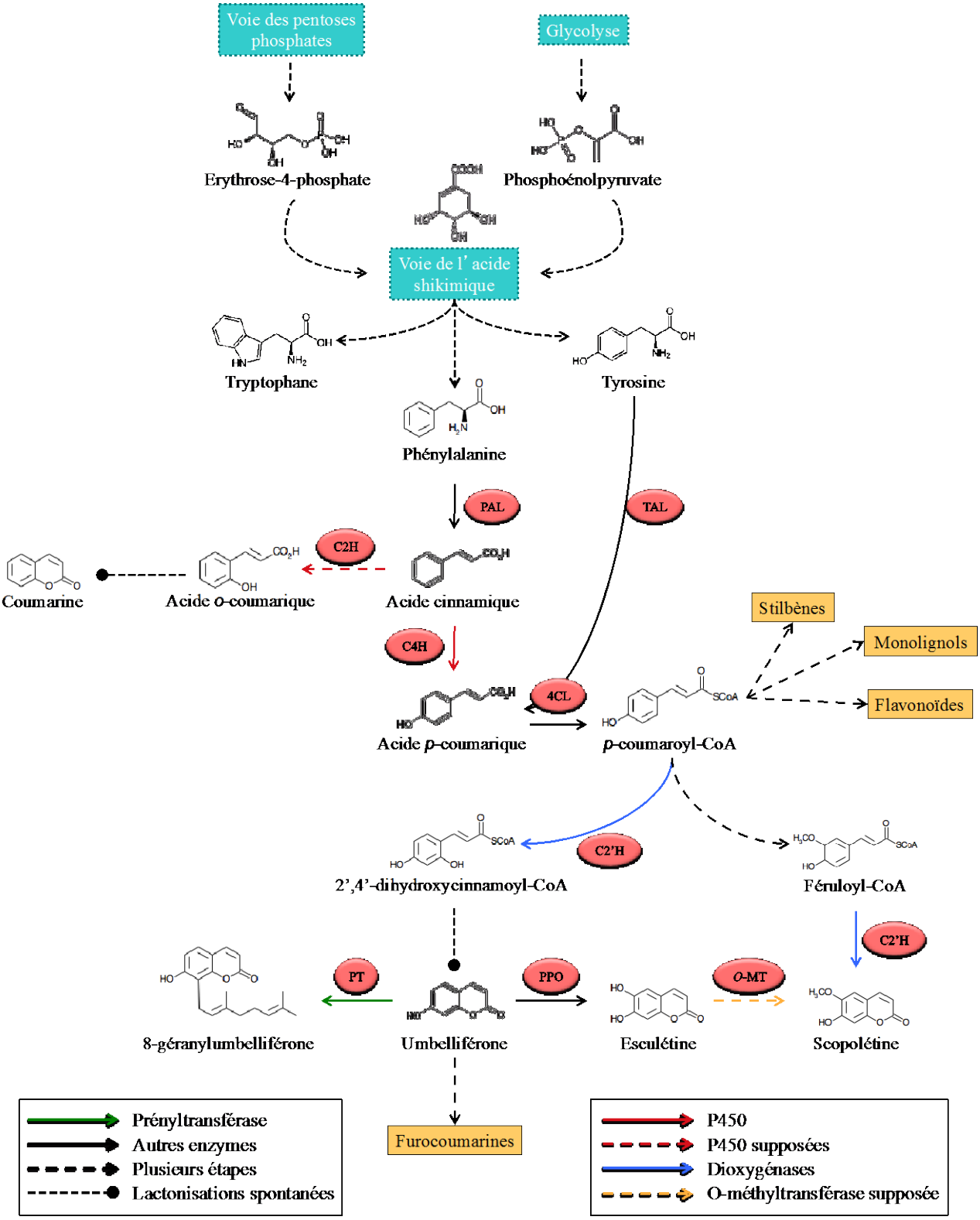


Figure 3. Voie de biosynthèse simplifiée des coumarines.

PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; TAL : tyrosine ammonia-lyase ; C2H : acide cinnamique 2-hydroxylase ; C4H : acide cinnamique 4-hydroxylase ; 4CL : 4-coumarate-CoA ligase ; CO2H : acide 4-coumarique 2-hydroxylase ; C2'H : *p*-coumaroyl-CoA 2'-hydroxylase ; PPO : polyphénol oxydase ; *O*-MT : *O*-méthyltransférase ; PT : prényltransférase.

Cette molécule est le précurseur d'autres coumarines comme par exemple l'esculétine, formée à partir de l'hydroxylation de l'umbelliférone en position 6 par une polyphénol oxydase (PPO) (Garcia-Molina *et al.*, 2013). L'esculétine et l'umbelliférone peuvent aussi être méthylées par des *O*-méthyltransférases (*O*-MT) pour donner la scopolétine et l'herniarine respectivement (Bourgaud *et al.*, 2006). L'umbelliférone permet aussi la formation de composés prénylés ou géranylés, comme par exemple la 8-géranylumbelliférone. Elle est formée par l'ajout de géranyl diphosphate (GPP) par une prényltransférase (PT) de citron, identifiée dans le cadre d'une collaboration impliquant notre laboratoire (Munakata *et al.*, 2014). Mais l'umbelliférone est aussi le précurseur des furocoumarines.

1.5.2 Synthèse des furocoumarines à partir des coumarines

La première étape permettant de s'engager dans la voie de biosynthèse des furocoumarines est la prénylation de l'umbelliférone (figure 4). Elle correspond à l'ajout d'un groupement diméthylallyl diphosphate (DMAPP) en position 6 ou 8 de l'umbelliférone pour donner respectivement la déméthylsubérosine, précurseur des furocoumarines linéaires et l'osthénol, précurseur des furocoumarines angulaires. Une prényltransférase catalysant ces deux réactions et localisée au niveau des plastides a récemment été identifiée chez le persil (*Petroselinum crispum*) dans notre laboratoire (Karamat *et al.*, 2014). Par ailleurs, une étude a montré que chez le céleri (*Apium graveolens)*, le DMAPP provenait majoritairement de la voie du 1-déoxy-D-xylulose (DOX) qui se déroule dans les plastides et non de la voie mévalonate dépendante (Stanjek *et al.*, 1999).

La cyclisation des groupements prényl sur les groupements hydroxyles des carbones 7 de la déméthylsubérosine et de l'osthénol permet la formation de la marmésine et de la columbianétine respectivement (figure 4). La marmésine synthase (MS) a été mise en évidence chez *Ammi majus* et serait vraisemblablement un cytochrome P450 (Hamerski et Matern, 1988b). En revanche, à ce jour, cette enzyme n'a toujours pas été caractérisée d'un point de vue moléculaire, tout comme la columbianétine synthase (CS).

Par la suite, les liaisons carbone-carbone des chaînes latérales de la marmésine et de la columbianétine peuvent être clivées pour mener à la formation du psoralène et de l'angélicine respectivement (figure 4). Ces deux réactions font intervenir la psoralène synthase (PS) et l'angélicine synthase (AS) respectivement qui sont des cytochromes P450 de la famille CYP71AJ qui ont été caractérisés dans notre laboratoire chez le panais (PS : CYP71AJ3 ; AS : CYP71AJ4), le céleri (PS : CYP71AJ2) et *A. majus* (PS : CYP71AJ1) (Larbat *et al.*, 2007 ; Larbat *et al.*, 2009). Le psoralène peut ensuite être hydroxylé en position 5 ou 8 pour donner respectivement le bergaptol et le xanthotoxol (figure 4). L'activité de psoralène-5-monoxygénase (P5M) a été mise en évidence chez *A. majus* et serait vraisemblablement un cytochrome P450 (Hamerski et Matern, 1988a). La psoralène-8-monooxygénase (P8M) a été caractérisée au sein de notre laboratoire par Célia Krieger au cours de sa thèse (Krieger, 2014). Il s'agit du cytochrome P450 CYP71AZ4 de panais qui hydroxyle le psoralène en position 8 pour donner le xanthotoxol. Ce cytochrome P450 est également capable de métaboliser d'autres substrats tels que la 6-méthoxycoumarine ou l'herniarine, mais leur affinité avec cette enzyme est plus faible.

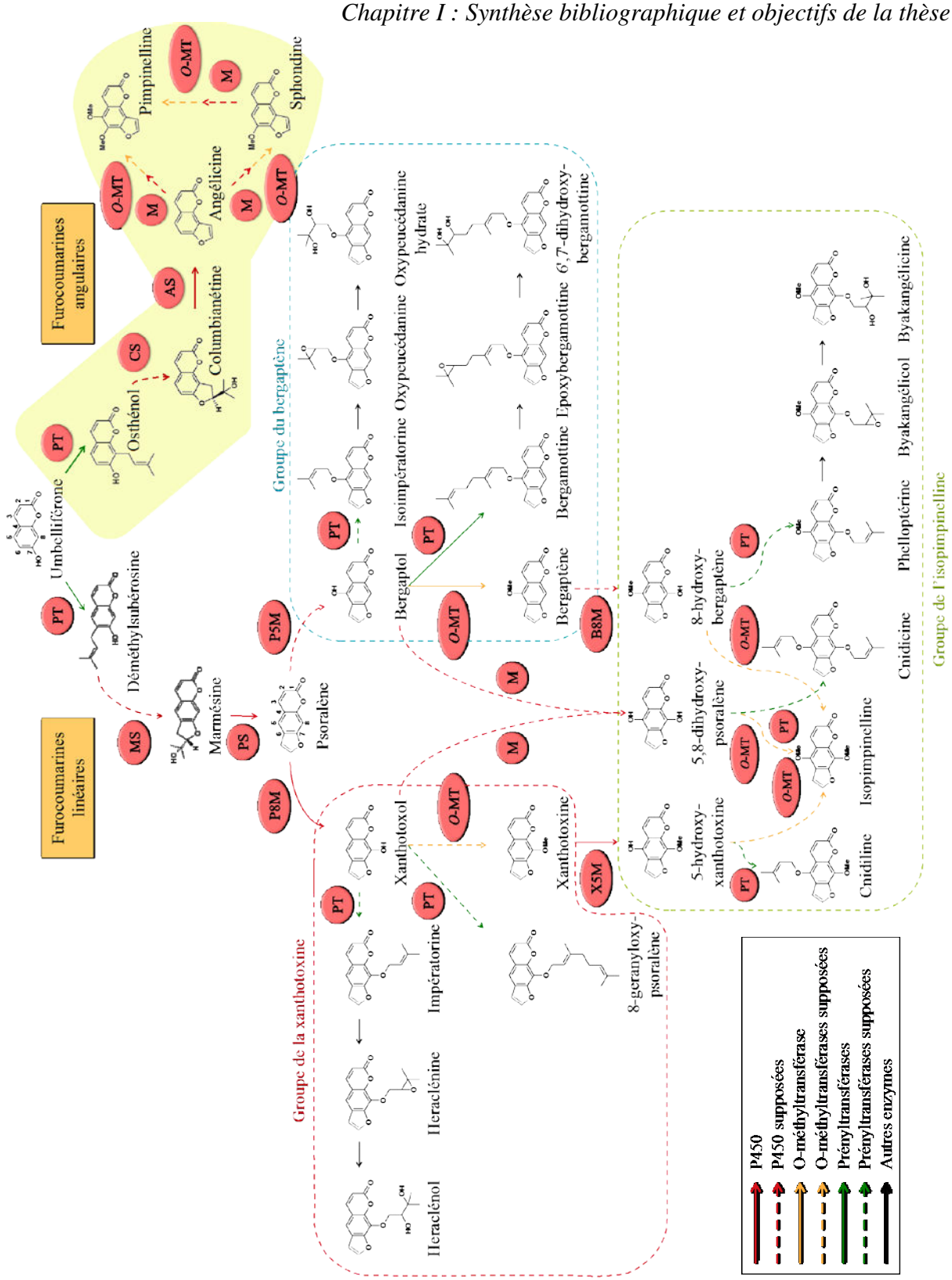


Figure 4. Voie de biosynthèse simplifiée des furocoumarines.

PT : prényltransférases ; MS : marmésine synthase ; CS : columbianétine synthase ; PS : psoralène synthase ; AS : angélicine synthase ; M : monooxygénases ; *O*-MT : *O*-méthyltransférases ; P8M : psoralène-8-monooxygénase ; P5M : psoralène-5-monooxygénase ; X5M : xanthotoxine-5-monooxygénase ; B8M : bergaptène-8-monooxygénase. Les molécules sur fond jaune sont des furocoumarines angulaires, non produites par les agrumes.

Le bergaptol et le xanthotoxol peuvent à leur tour être méthylés pour donner le bergaptène (5-méthoxypsoralène ou 5-MOP) et la xanthotoxine (8-méthoxypsoralène ou 8-MOP) respectivement (figure 4). Ces molécules hydroxylées en position 8 et 5 donnent le 8-hydroxy-bergaptène et la 5-hydroxy-xanthotoxine respectivement. La xanthotoxine-5-monooxygénase (X5M) a déjà été caractérisée chez différentes plantes. Chez *Arabidopsis thaliana*, la réaction est effectuée par les CYP82C2 et CYP82C4 (Kruse *et al.*, 2008). Pourtant, cette plante n'a pas la capacité de produire des furocoumarines. Il est donc possible que cette activité soit opportuniste et permette simplement à la plante de détoxifier ces molécules. Une étude récente a d'ailleurs montré que CYP82C2 d'*A. thaliana* intervient également dans la synthèse de 4-hydroxyindole-3-carbonyle nitrile à partir d'indole-3-carbonyle nitrile (Rajniak *et al.*, 2015). En revanche, chez *A. majus* et chez le panais qui produisent des furocoumarines, l'hydroxylation de la xanthotoxine en position 5 est effectuée par CYP71AZ1 et CYP71AZ6 respectivement (Roselli *et al.*, manuscrit en préparation). L'existence d'une même activité d'hydroxylation de la xanthotoxine en position 5, effectuée par deux enzymes appartenant à des familles différentes, suggère une évolution convergente de ces cytochromes P450, ayant conduit à l'apparition de la voie des furocoumarines de manière indépendante, entre différents groupes taxonomiques de végétaux supérieurs. La bergaptène-8-monooxygénase (B8M) n'a par contre pas encore été caractérisée pour le moment.

Le 8-hydroxy-bergaptène et la 5-hydroxy-xanthotoxine sont des précurseurs de l'isopimpinelline (figure 4). Les deux séries de méthylations intervenant avant et après ces composés, seraient effectuées par deux *O*-méthyltransférases (isolées à partir d'extraits de *R. graveolens*) intervenant uniquement en position 5 ou 8 (Thompson *et al.*, 1978). L'une d'entre elles permettrait donc la méthylation en position 5 du bergaptol (donnant le bergaptène) et de la 5-hydroxy-xanthotoxine (donnant l'isopimpinelline), tandis que l'autre permettrait la méthylation en position 8 du xanthotoxol (donnant la xanthotoxine) et du 8-hydroxy-bergaptène (donnant l'isopimpinelline). Chez *A. majus*, une de ces *O*-méthyltransférases a été caractérisée et permet la conversion du bergaptol en bergaptène (Hehmann *et al.*, 2004). Différentes études visaient à déterminer le précurseur préférentiel de l'isopimpinelline. L'une d'elles a montré que la xanthotoxine était le précurseur le plus efficace pour la synthèse de l'isopimpinelline devant le bergaptène, mais que des déméthylations suivies de reméthylations étaient nécessaires (Brown et Sampathkumar, 1977). Plus tard, il a été montré que le 5,8-dihydroxy-psoralène était le précurseur préférentiel de l'isopimpinelline et cela devant la xanthotoxine (17 fois moins convertie) qui elle-même est devant le bergaptène (170 fois moins converti) (Innocenti *et al.*, 1983).

Du côté des furocoumarines angulaires, l'angélicine peut aussi mener à divers composés hydroxylés et méthylés en position 5 et 6 (figure 4) pour former des précurseurs de la pimpinelline (Bourgaud *et al.*, 2006). Cependant, aucune de ces étapes n'a été caractérisée pour le moment.

Les furocoumarines présentent d'autres décorations telles que des prénylations ou des géranylations (effectuées par des prényltransférases) qui peuvent être suivies par des époxydations (effectuées par des époxydases), elles-mêmes suivies par des hydroxylations d'époxydes formant alors des diols (effectuées par des époxydes hydroxylases). Des chercheurs étudiant la prénylation des coumarines dans des fractions microsomales de peau de

Citrus limon (citron) ont mis en évidence une importante activité d'une *O*-prényltransférase, catalysant la conversion du bergaptol en bergamottine, grâce à l'ajout d'un groupement GPP (Munakata *et al.*, 2012). De même que pour le bergaptol, le xanthotoxol et le 5,8-dihydroxy-psoralène peuvent être prénylés ou géranylés puis époxydés et hydroxylés pour aboutir à différents composés que l'on peut répartir en trois groupes distincts (figure 4) :

- Groupe du bergaptène : isoimpératorine, oxypeucédanine, oxypeucédanine hydrate (composés prénylés) et bergamottine, époxybergamottine, 6',7'-dihydroxybergamottine (composés géranylés) ;
- Groupe de la xanthotoxine : impératorine, héraclénine, héraclénol (composés prénylés) et 8-géranyloxypsoralène (composé géranylé) ;
- Groupe de l'isopimpinelline : cnidiline, cnidicine, phelloptérine, byakangélicol, byakangélicine (composés prénylés).

1.6 Propriétés physico-chimiques : cas des furocoumarines

1.6.1 Photooxydation et photolyse

En présence d'un rayonnement UVA (320-400 nm), les furocoumarines sont susceptibles de subir des réactions de photooxidation, pouvant générer des espèces oxygénées réactives ($^1O_2$, H_2O_2, $H_2O^\bullet$) impliquées dans l'apoptose cellulaire (Mignotte et Vayssiere, 1998). Il a également été montré que le psoralène et la xanthotoxine peuvent subir des réactions de photolyse engendrant la formation de produits toxiques tels que des aldéhydes, des acides carboxyliques et du péroxyde d'hydrogène (Marley *et al.*, 1995). La formation de ces produits et en particulier des aldéhydes, pourrait être à l'origine du caractère phototoxique des furocoumarines.

1.6.2 Photoactivation et photocycloadditions

Lorsqu'elles sont soumises à un rayonnement UV, les furocoumarines ont la capacité de se fixer à différentes macromolécules dans la cellule.

1.6.2.1 Sur l'ADN

Les furocoumarines peuvent subir des phénomènes de photocycloaddition avec des acides nucléiques (figure 5). Ce mécanisme se déroule en trois étapes et est décrit pour la xanthotoxine par Kitamura et ses collègues (Kitamura *et al.*, 2005). La xanthotoxine rejoint le noyau de la cellule et s'intercale dans la chaîne d'acide d'ADN (étape 1), après l'absorption d'un photon, la xanthotoxine forme deux premières liaisons covalentes avec une base pyrimidique (préférentiellement la thymine) d'un brin d'ADN (étape 2), l'absorption d'un deuxième photon est suivie de la formation de deux nouvelles liaisons covalentes avec une thymine de l'autre brin d'ADN (étape 3). Une étude a montré que le psoralène, une furocoumarine linéaire, présente une plus forte génotoxicité que l'angélicine, son isomère

angulaire (Wamer *et al.*, 1995). L'explication peut être que les furocoumarines linéaires forment des di-adduits avec l'ADN, alors que les furocoumarines angulaires ne forment que des mono-adduits. Quoi qu'il en soit, la photocycloaddition des furocoumarines sur l'ADN provoque une modification de sa structure, pouvant alors empêcher la réplication et finalement la prolifération des cellules (Sasaki *et al.*, 1988) ou engendrer des recombinaisons à l'origine de mutations dans la séquence d'ADN (Dardalhon *et al.*, 1998).

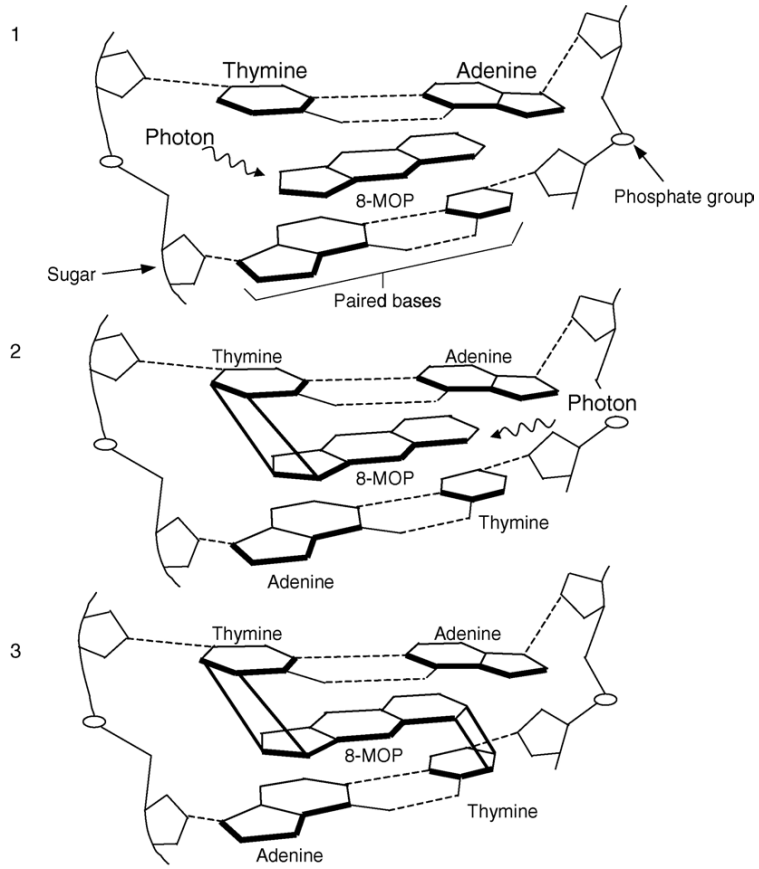


Figure 5. Représentation schématique de la photocycloaddition de la xanthotoxine sur l'ADN double brin (Kitamura et al., 2005).

1.6.2.2 Sur les protéines

Les furocoumarines peuvent aussi interférer avec différentes protéines présentes dans la cellule suite à une exposition aux UVA. Elles peuvent par exemple : interagir avec des récepteurs membranaires ou cytosoliques, se lier avec des protéines membranaires, inactiver des enzymes ou encore inactiver des ribosomes (Dall'Acqua et Martelli, 1991). Une étude a montré que ces interactions sont plus ou moins importantes en fonction de la nature des furocoumarines, mais aussi des protéines (Veronese *et al.*, 1981). Par ailleurs, les furocoumarines peuvent également interagir avec certaines protéines qui sont les cytochromes P450, en l'absence d'excitation par des rayonnements UV. Je détaillerai plus loin ce phénomène (paragraphe 1.8.2).

1.6.2.3 Sur les acides gras

Les furocoumarines ont la capacité de se fixer sur les doubles liaisons covalentes de certaines molécules (Shim et kim, 1983) et notamment les acides gras en présence d'un rayonnement UVA. Une étude a montré que le psoralène peut former un cyclo-adduit avec l'acide linolénique au niveau des carbones 12 et 13, formant alors une molécule ayant une structure comparable au diacylglyérol et étant capable comme lui, d'activer la protéine kinase C (PKC) dans des plaquettes humaines (Caffieri *et al.*, 1994). Dans les mélanocytes, cette cascade de réactions conduit à la mélanogénèse (figure 6) selon le mécanisme théorisé par Anthony et ses collègues (Anthony *et al.*, 1997) : les UVA activent la xanthotoxine qui se fixe de manière covalente sur un phospholipide (étape 1) ; les UVA induisent l'activité de la phospholipase A_2 (PLA_2) qui hydrolyse le complexe xanthotoxine-phospholipide (étape 2) ; l'adduit xanthotoxine-acide gras est libéré dans le cytosol (étape 3) ; l'adduit xanthotoxine-acide gras se substitue au diacylglycérol et active la protéine kinase C (étape 4) ; l'activation de la PKC initie la voie de biosynthèse conduisant à la mélanogénèse (étape 5). Ce phénomène de photocycloaddition explique les réactions d'hyperpigmentations de la peau suite à un contact prolongé avec les furocoumarines.

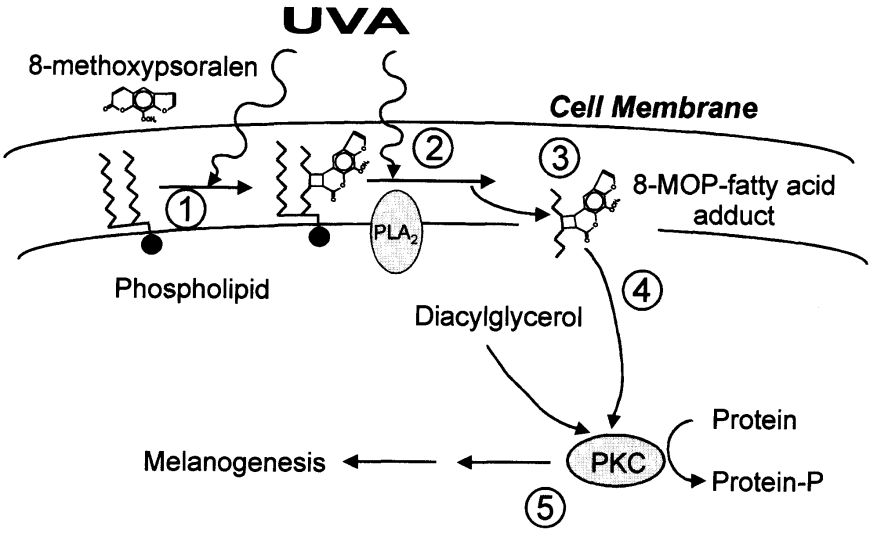


Figure 6. Mécanisme théorique de l'activation de la protéine kinase C par l'adduit xanthotoxine-acide gras déclenchant la mélanogénèse (Anthony *et al.*, 1997).

1.7 Utilisations thérapeutiques des coumarines et furocoumarines

1.7.1 Propriétés bénéfiques des coumarines pour l'homme

Les coumarines possèdent plusieurs propriétés très intéressantes pour l'homme et sont parfois valorisées par les industries pharmaceutiques. Par exemple, elles sont bien connues pour leur activité anticoagulante. Aujourd'hui, la warfarine, aussi appelée coumaphène, est une des molécules les plus utilisées en tant qu'anticoagulant oral (Cravotto *et al.*, 2001). De façon générale, les médicaments coumariniques sont utilisés dans le but de prévenir la formation de caillots sanguins ou d'empêcher leur développement.

Certaines coumarines présentent aussi des propriétés anti-inflammatoires comme c'est le cas de celles présentes dans des extraits de *Murraya alata*, dont l'effet est comparable à celui de l'indométacine, un anti-inflammatoire couramment utilisé (Lv *et al.*, 2015). Ces coumarines agissent en inhibant la production de monoxyde d'azote, une molécule signal impliquée dans les processus inflammatoires.

Une autre étude a montré que l'umbelliférone est une molécule hypoglycémiante qui permet de revenir à des taux normaux de glucose dans le sang (certainement *via* une augmentation du taux d'insuline sanguine) chez des rats rendus diabétiques (Ramesh et Pugalendi, 2005). Dans cette même étude, il a été mis en évidence que l'umbelliférone possède également un pouvoir antioxydant chez ces rats.

Outre ces propriétés, les coumarines se révèlent aussi anticancéreuses et antidépressives. En effet, une première étude a montré que l'auraptène, une coumarine géranylée, intervenait dans la prévention de la tumorigénèse de la peau chez la souris et cela de façon plus efficace que l'umbelliférone qui ne possède pas de groupement géranyl (Murakami *et al.*, 1997). Plus récemment, une étude effectuée sur des souris en condition de nage forcée a montré que le temps d'immobilité, montrant une résignation de l'animal associée à un comportement dépressif, était réduit chez les souris ayant reçu une dose optimale de coumarines (Sashidhara *et al.*, 2011).

1.7.2 Propriétés bénéfiques des furocoumarines pour l'homme

1.7.2.1 La photochimiothérapie

Comme je l'ai décrit plus haut, les furocoumarines ont la capacité de se fixer sur l'ADN en présence d'un rayonnement UV (Kitamura *et al.*, 2005), modifiant alors sa structure, ce qui empêche sa réplication et donc la prolifération des cellules (Sasaki *et al.*, 1988). Ce phénomène a été détourné dans le but de traiter des maladies de peau comme le psoriasis et le vitiligo (Parrish *et al.*, 1974 ; Pathak et Fitzpatrick, 1992), qui se caractérisent par des lésions rouges et une dépigmentation de la peau respectivement. Le traitement combine ainsi l'application de furocoumarines et d'un rayonnement UVA sur la peau et porte le nom de P-UVA thérapie, le P venant à l'origine du psoralène.

Concernant le psoriasis, une étude récente a montré que la combinaison de xanthotoxine et d'UVA provenant du soleil permettait d'améliorer l'apparence physique des patients atteints de cette maladie, tout comme leur qualité de vie (Gahalaut *et al.*, 2014). Pour

le vitiligo, une autre étude visait à comparer l'usage de la P-UVA thérapie avec la photothérapie UVB à bande étroite, n'utilisant pas de furocoumarines (Sapam *et al.*, 2012). Il s'avère que les deux thérapies présentent des résultats similaires en termes de repigmentation de la peau (figure 7). Cependant, les effets secondaires sont beaucoup plus fréquents chez les patients ayant suivi une P-UVA thérapie, qui se plaignaient de démangeaisons, d'hyperpigmentation de la peau, de vertiges, d'érythèmes ou épaississements cutanés ou encore de nausées. Par ailleurs, à long terme, la P-UVA thérapie peut aussi engendrer des problèmes oculaires ou même des cancers de la peau (Momtaz et Fitzpatrick, 1998).

Figure 7. Amélioration de l'aspect visuel de la peau après un traitement UV chez des patients atteints de vitiligo (Sapam *et al.*, 2012).

(A) Après un traitement de 6 mois de P-UVA thérapie ; (B) Après un traitement de 6 mois de photothérapie UVB à bande étroite.

1.7.2.2 Propriétés anticancéreuses des furocoumarines

Plusieurs études ont montré le rôle bénéfique des furocoumarines dans la prévention et même la guérison de certains cancers. Par exemple, le 8-géranyloxypsoralène, la bergamottine et la 5-géranyloxy-7méthoxycoumarine interviennent dans des phénomènes d'inhibition de la carcinogénèse, *via* l'inhibition de la synthèse d'oxyde d'azote, toxique pour les cellules (Miyake *et al.*, 1999). L'inhibition de certains cytochromes P450 par des furocoumarines comme l'impératorine et l'isopimpinelline, a aussi un effet inhibiteur sur la carcinogénèse dans des glandes mammaires de souris (Prince *et al.*, 2006). Cet effet est plus important qu'avec les coumarines simples comme la coumarine et le citroptène.

Par ailleurs, la P-UVA thérapie peut également être utilisée pour soigner certains cancers, comme par exemple les lymphomes T cutanés (Geskin, 2007). Il peut cependant en résulter une photosensibilité accrue et des cancers de la peau non-mélanomes.

1.8 Toxicité des coumarines et furocoumarines

1.8.1 Phototoxicité des coumarines et furocoumarines

Si le phénomène de photocycloaddition des furocoumarines sur l'ADN est détourné dans le cadre de la P-UVA thérapie pour traiter les maladies de peau, il se révèle aussi problématique chez des personnes saines exposées à des furocoumarines et aux UV. En effet, une telle exposition peut entraîner dans les 24 heures des dermatites (figure 8), parfois graves, telles que des brûlures, des gonflements, une hyperpigmentation de la peau ou encore des cloques (Abramowitz *et al.*, 1993). Ces phénomènes de phototoxicité peuvent aussi bien se produire suite à un contact cutané (Robl *et al.*, 2013), que suite à l'ingestion de furocoumarines présentes dans des plantes, comme les chénopodes parfois cuisinés et mangés frais (Calka *et al.*, 2005).

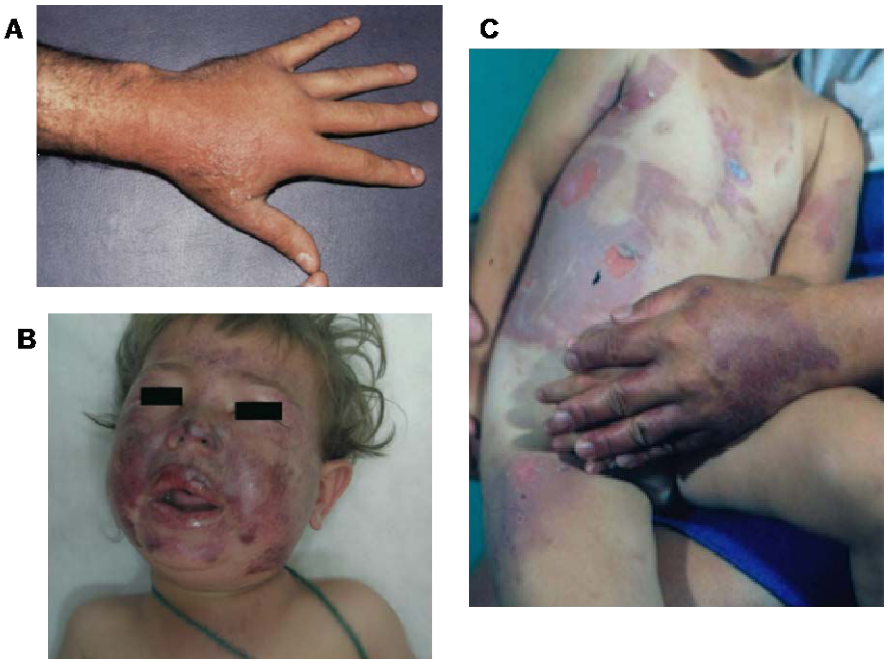


Figure 8. Photophytodermatoses chez des patients ayant été en contact ou ayant ingéré des furocoumarines et s'étant exposés au soleil.

(A) Brûlures et cloques sur la main d'un homme ayant pressé cinq douzaines de limes pour préparer des Margaritas ; (B) Sévères brûlures et œdèmes sur le visage d'un enfant ayant mangé des chénopodes ; (C) Brûlures sur la main d'une mère et le tronc de son enfant, la mère ayant préparé un repas à base de fruits de mer et de jus de citron puis ayant étalé de la crème solaire sur son enfant.

De nombreuses furocoumarines ont été montrées comme étant phototoxiques (tableau 1). Concernant les coumarines, une étude a montré que le citroptène l'était également (Raquet et Schrenk, 2014). Chez l'homme, cette phototoxicité n'intervient qu'à partir d'une dose seuil de furocoumarines ingérées. Une première étude a montré que l'ingestion de 14 mg de xanthotoxine (correspondant à environ à 0,23 mg/kg de poids corporel pour un adulte de 60

kg) combinée à une exposition à des UVA, est suffisante pour détecter les premiers effets phototoxiques (Brickl *et al.*, 1984). Plus tard, il a été montré qu'une dose de furocoumarines combinant 10 mg de xanthotoxine et 10 mg de bergaptène (0,25 mg/kg de poids corporel pour un adulte de 60 kg) est équivalente à une dose de 15 mg de xanthotoxine vis-à-vis des effets phototoxiques observés (Schlatter *et al.*, 1991). Très peu d'études ont permis de vérifier si ces doses peuvent être atteintes dans le cadre de notre alimentation. En 2010, une équipe de recherche concluait que dans le cadre d'un régime alimentaire occidental, la première source d'exposition aux furocoumarines provenait du jus de pomelo et qu'il faudrait en consommer 1,2 L par jour pour dépasser la quantité de 20 mg de furocoumarines (Gorgus *et al.*, 2010).

	Phototoxicité	Référence
Coumarines		
Umbelliférone	Non	(Ojala *et al.*, 1999)
Osthol	ND	-
Auraptène	ND	-
Epoxyauraptène	ND	-
Citroptène	Oui	(Raquet et Schrenk, 2014)
5-géranyloxy-7-méthoxycoumarine	ND	-
Furocoumarines		
Psoralène	Oui	(Pathak *et al.*, 1960 ; Raquet et Schrenk, 2014)
Bergaptol	Non	(Messer *et al.*, 2012 ; Raquet et Schrenk, 2014)
Bergaptène	Oui	(Naganuma *et al.*, 1985 ; Messer *et al.*, 2012)
Isoimpératorine	ND	-
Oxypeucédanine	Oui	(Naganuma *et al.*, 1985)
Oxypeucédanine hydrate	Oui	(Raquet et Schrenk, 2014)
Bergamottine	Oui	(Messer *et al.*, 2012)
Epoxybergamottine	Oui	(Raquet et Schrenk, 2014)
6',7'-dihydroxybergamottine	Oui	(Messer *et al.*, 2012 ; Raquet et Schrenk, 2014)
Xanthotoxol	Non	(Raquet et Schrenk, 2014)
Xanthotoxine	Oui	(Pathak *et al.*, 1960)
Impératorine	Oui	(Colombain *et al.*, 2001; Raquet et Schrenk, 2014)
Héraclénine	Oui	(Raquet et Schrenk, 2014)
Héraclénol	Oui	(Colombain *et al.*, 2001)
8-géranyloxypsoralène	ND	-
5-hydroxy-xanthotoxine	ND	-
Isopimpinelline	Non	(Lohr *et al.*, 2010 ; Raquet et Schrenk, 2014)
Phelloptérine	Non	(Raquet et Schrenk, 2014)
Byakangélicol	ND	-
Byakangélicine	Non	(Raquet et Schrenk, 2014)
Cnidiline	ND	-
Cnidicine	ND	-

Tableau 1. Évaluation de la phototoxicité de diverses coumarines et furocoumarines.

ND = Non déterminé.

1.8.2 Inhibition des cytochromes P450 par les furocoumarines

1.8.2.1 Découverte de l'effet pomelo

Nous l'avons vu précédemment, les furocoumarines ont la capacité de se fixer sur certaines protéines et d'interagir avec elles (Dall'Acqua et Martelli, 1991). En particulier, les furocoumarines peuvent inhiber certains cytochromes P450 appartenant à diverses familles (Wangensteen *et al.*, 2003 ; Gravot *et al.*, 2004).

L'origine de cette découverte tient à une étude effectuée en 1989 et visant à étudier les interactions entre la Félodipine (un médicament contre l'angine de poitrine et l'hypertension) et l'éthanol (Bailey *et al.*, 1989). Pour masquer le goût de cet alcool, il avait été décidé d'y ajouter du jus de pomelo. Les résultats de cette étude ont mis en évidence des concentrations en Félodipine dans le plasma beaucoup plus élevées que dans d'autres études ayant utilisé la même dose médicamenteuse. Ayant constaté qu'il n'y avait pourtant pas eu de problème de dosage, Bailey et ses collègues ont décidé d'évaluer l'impact du jus de pomelo en comparaison avec l'eau sur la concentration sanguine en Félodipine. Les résultats ont alors montré une concentration en Félodipine dans le plasma beaucoup plus forte dans le cas de sa consommation avec du jus de pomelo (Bailey *et al.*, 1998). Suite à cette découverte, le phénomène a été baptisé « effet pomelo ».

L'effet pomelo est lié à l'inhibition de CYP3A4, un cytochrome P450 exprimé dans les entérocytes et les hépatocytes (Lown *et al.*, 1997) et responsable de la première étape de métabolisation (Chen *et al.*, 2011) de probablement plus de la moitié des médicaments qui sont altérés par oxydation (Wilkinson, 2005). L'inhibition des CYP3A4 engendre une augmentation de la biodisponibilité des médicaments (figure 9, Bailey *et al.*, 1998), ce qui peut provoquer de graves effets secondaires (Bailey *et al.*, 2013). Les tableaux de l'annexe 1 récapitulent pour différents types de médicaments, les effets secondaires qui peuvent être observés, s'ils sont ingérés en combinaison avec du pomelo. Depuis une quinzaine d'années, divers événements sérieux liés à l'effet pomelo ont été reportés (pour revue, voir Bailey *et al.*, 2013). À titre d'exemple, la consommation d'un pomelo entier par jour pendant 3 jours avant un traitement à l'éthinylestradiol (présent dans les pilules contraceptives) a provoqué une thrombose veineuse chez une femme de 42 ans (Grande *et al.*, 2009).

D'après le docteur David G. Bailey, les points importants à retenir en lien avec l'effet pomelo sont les suivants (Bailey *et al.*, 2013) :

1. En 2013, plus de 85 médicaments sont pointés du doigt quant à leur interaction possible avec les furocoumarines. Parmi eux, 43 pourraient être responsables de sérieux effets secondaires.
2. Les pomelos et les agrumes apparentés aux pomelos peuvent inhiber les CYP3A4 et doivent donc être écartés pendant un traitement médicamenteux identifié comme étant problématique. Le médecin peut également prescrire un autre médicament ne présentant pas d'interactions avec les furocoumarines.

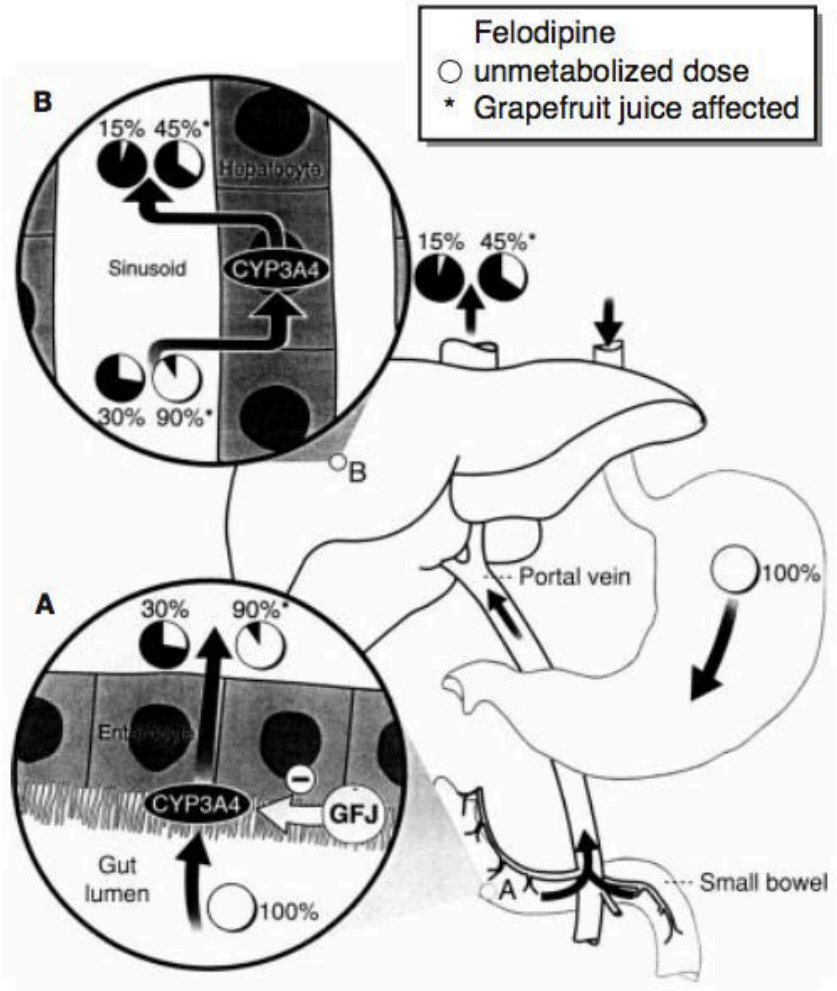


Figure 9. Métabolisation de la Félodipine par CYP3A4 suite à l'ingestion de jus de pomelo ou non (Bailey *et al.*, 1998).

(A) Dans les intestins : la dose de Félodipine ingérée subit une première métabolisation par CYP3A4 au niveau des entérocytes. En présence de jus de pomelo, la dose de Félodipine non métabolisée s'élève à 90 %, alors qu'elle n'est que de 30 % en l'absence de jus de pomelo. (B) Dans le foie : la métabolisation de la dose de Félodipine ingérée se poursuit au niveau des hépatocytes. Après le passage dans le foie, 45 % de la dose initiale de Félodipine n'a toujours pas été métabolisée dans le cas d'une ingestion combinée avec du jus de pomelo. En revanche, elle n'est plus que de 15 % en l'absence de jus de pomelo.

1.8.2.2 Furocoumarines impliquées dans l'effet pomelo

Beaucoup de scientifiques s'accordent sur la contribution du bergaptol et de ses dérivés (en particulier le bergaptène, la bergamottine, l'époxybergamottine et la 6',7'-dihydroxybergamottine) à l'effet pomelo (Ohnishi *et al.*, 2000 ; Wangensteen *et al.*, 2003 ; Kimura *et al.*, 2010 ; Messer *et al.*, 2012). Cependant, les molécules ayant la plus grande capacité d'inhibition des cytochromes P450 sont les paradisines, des dimères de furocoumarines (Ohnishi *et al.*, 2000 ; Ohta *et al.*, 2002). Concernant les monomères de furocoumarines, la 6',7'-dihydroxybergamottine présente un pouvoir d'inhibition des CYP3A4 plus fort que la bergamottine, elle même plus forte que le bergaptène qui est lui-même plus élevé que le bergaptol (Ohnishi *et al.*, 2000). Basé sur ce genre de résultats, Row

et ses collègues ont évalué l'importance de quatre sites (présentés ici sur la bergamottine, figure 10) quant aux interactions avec CYP3A4 (Row *et al.*, 2006) :

a) La chaîne alcénique est une région qui interagit de façon plus efficace dans le site actif de l'enzyme si elle est allongée (groupement géranyl par rapport à un groupement prényl) ;
b) La présence d'un groupement alcool ou époxyde en position 6'-7' de la chaîne alcénique est à l'origine d'une différence de potentiel inhibiteur, l'époxyde étant plus efficace que le diol ;
c) Le cycle furane est indispensable à la fixation de la furocoumarine sur CYP3A4 ; c'est pour cela que les coumarines n'interagissent pas avec ces enzymes ;
d) La lactone ne présente pas d'importance quant à la fixation des furocoumarines sur CYP3A4 puisque les coumarines en possèdent aussi et n'interagissent pas avec ces enzymes.

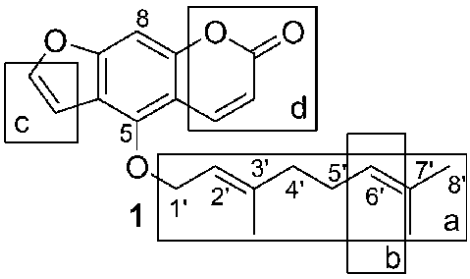


Figure 10. Proposition de sites pouvant intervenir dans les interactions entre la bergamottine et CYP3A4 (Row *et al.*, 2006).

1.8.2.3 Lutte engagée contre l'effet pomelo

Depuis que l'effet pomelo a été rapporté, plusieurs scientifiques se sont penchés sur la possibilité de l'élimination des furocoumarines présentes dans les produits alimentaires ou cosmétiques. Ces techniques s'appuient principalement sur les propriétés physico-chimiques de ces composés. En effet, les furocoumarines peuvent être adsorbées par des champignons vivants et mêmes autoclavés (Myung, Manthey, *et al.*, 2008 ; Myung, Narciso, *et al.*, 2008), elles peuvent être dégradées par la chaleur (Uesawa et Mohri, 2006a; Cancalon *et al.*, 2011) ou par une irradiation aux UV (Uesawa et Mohri, 2006b) et peuvent aussi être extraites grâce à des systèmes de filtration industriels utilisés pour les jus (Paine *et al.*, 2006). Cependant, ces traitements peuvent s'avérer très coûteux et peuvent altérer la qualité des produits dérivés de ces agrumes.

2. Présentation des agrumes, des plantes productrices de coumarines et furocoumarines

2.1 Description botanique des agrumes

Les agrumes sont des angiospermes dicotylédones appartenant à l'ordre des Sapindales et à la famille des Rutacées (sous-famille des Aurantioideæ, tribu des Citreæ, sous-tribu des Citrinæ). Cette famille comprend environ 160 genres et 1900 espèces de plantes (Groppo *et al.*, 2008). Le groupe formé par les agrumes vrais comprend six genres sexuellement compatibles qui sont : *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* et *Clymenia* (Scora, 1975).

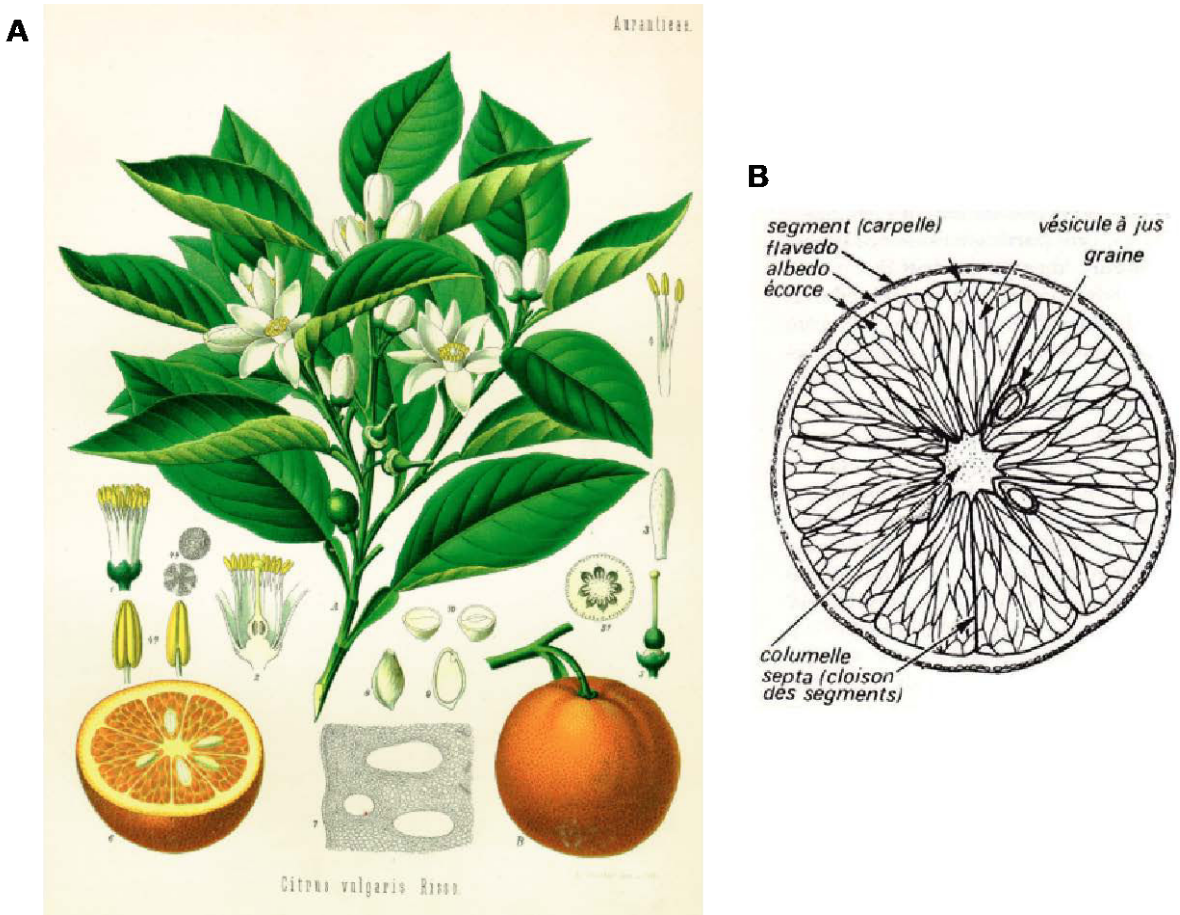


Figure 11. Planches illustratives de *Citrus sinensis* (oranger doux).

(A) Branche, fleurs et fruits d'oranger doux (Köhler, 1887) ; (B) Coupe transversale d'orange douce (Praloran, 1971).

Les agrumes sont des arbres ou arbustes allant de trois à quinze mètres de haut (Chegrani-Conan, 2009). Leurs feuilles sont luisantes, simples ou trifoliées, persistantes et présentent généralement un pétiole ailé (figure 11-A). Les branches sont souvent munies d'épines plus ou moins grandes. Les fleurs sont hermaphrodites et possèdent généralement cinq pétales blancs (parfois teintés de rose) et 20 à 40 étamines entourant l'ovaire fixé sur un disque nectarifère (Praloran, 1971). Les feuilles et fleurs produisent des essences ayant une

odeur caractéristique. Les fruits sont de taille et de forme variables en fonction des variétés d'agrumes. Ils sont composés de trois couches concentriques : deux formant la peau (péricarpe) et une formant la pulpe (endocarpe). La peau est constituée d'une écorce extérieure colorée appelée flavédo, zeste ou épicarpe et d'une couche moyenne blanche et spongieuse appelée albédo ou mésocarpe (figure 11-B). Le flavédo peut être vert ou jaune à rouge en fonction de sa composition en flavonoïdes (pigments) et présente des glandes schizolysigènes contenant des essences conférant leur odeur caractéristique aux agrumes. L'albédo est plus ou moins épais selon les espèces ; il peut aller de quelques millimètres chez certaines mandarines à plus de cinq centimètres chez certains cédrats ou pamplemousses. Quant à l'endocarpe, il est constitué de différents segments ou carpelles contenant des poils à jus et des pépins et entourés d'une membrane appelée septa (figure 11-B).

2.2 Origine et diffusion géographiques des agrumes

Les agrumes sont originaires du sud-est asiatique (figure 12) et en particulier d'un foyer principal comprenant le nord du Myanmar et la région Assam (Tanaka, 1933). Ils se seraient ensuite dispersés vers des centres secondaires à l'ouest (sud de l'Himalaya et Inde), à l'est (Chine du sud) et au sud (péninsule indochinoise). Il existerait deux autres centres secondaires d'origine des agrumes qui sont la région côtière de la Chine du sud (îles de Haïnan, Taïwan et sud du Japon) et l'Insulinde jusqu'aux îles Samoa et Fidji.

Il semblerait que l'agrumiculture existe depuis le premier millénaire avant J.-C. en Inde et en Chine (Praloran, 1971). Cependant, ce ne serait qu'à partir des XIX^{ème} et XX^{ème} siècles qu'elle se serait répandue dans le monde entier (Jacquemond *et al.*, 2013) (figure 12). Le premier agrume introduit dans le bassin méditerranéen serait le cédrat à l'époque d'Alexandre le Grand (IIIème siècle avant J.-C.), qui avait des usages cosmétiques et pharmaceutiques. Il semblerait que les autres variétés d'agrumes (en particulier l'oranger, le bigaradier et le citronnier) ne soient arrivées en Occident qu'à partir du X^{ème} siècle, lors des échanges commerciaux entre le bassin méditerranéen et l'Asie. Par la suite, les orangers furent introduits au Maghreb et à l'ouest de la Méditerranée par les Maures. Le second voyage de Christophe Colomb en 1493 a permis l'implantation des agrumes aux Caraïbes qui ont ensuite été dispersés sur tout le continent américain aux XVI^{ème} et XVII^{ème} siècles. Il est à noter que contrairement aux autres agrumes (dont les pamplemousses), les pomelos sont originaires de l'île Barbade dans les Caraïbes (Corazza-Nunes 2002). Finalement, les mandariniers et clémentiniers ne sont apparus en Europe qu'aux XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècles respectivement. Si aujourd'hui la consommation d'agrumes paraît banale, il faut savoir que jusqu'à la moitié du XX^{ème} siècle, les oranges étaient considérées comme un produit de luxe et étaient souvent offertes aux enfants pour Noël.

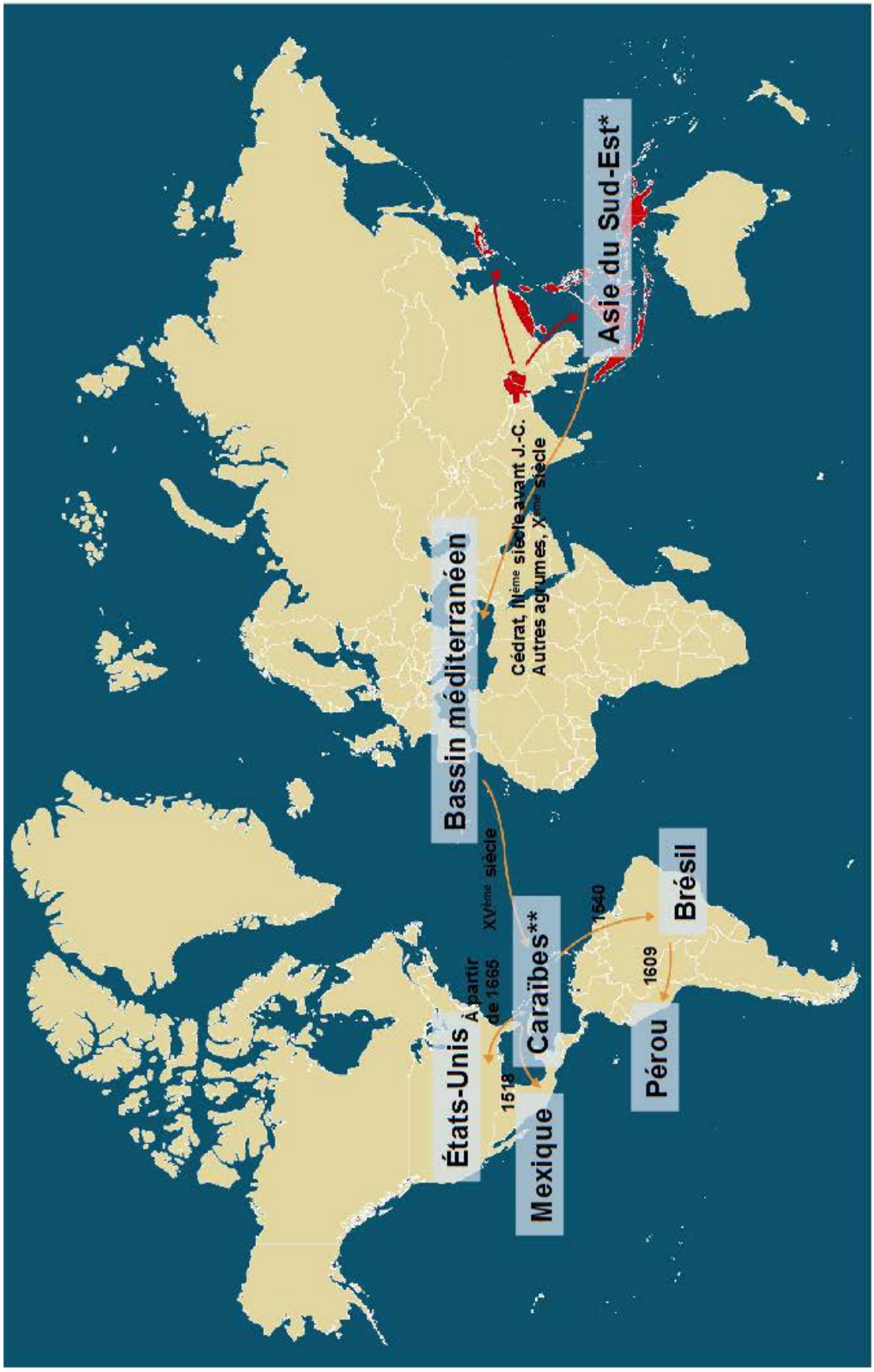


Figure 12. Origine géographique et dispersion des agrumes dans le monde.

*Origine et aire de répartition primaire ; **Aires de répartition secondaires. Figure adaptée de Jacquemond *et al.*, 2013.

2.3 Diversité génétique des agrumes

2.3.1 Phylogénie et taxonomie

Il existe une très grande diversité phénotypique chez les agrumes vrais. À titre indicatif, la station INRA-CIRAD de San Giuliano en Corse qui sert de conservatoire génétique, regroupe plus de 1000 espèces différentes. Cette grande diversité d'agrumes est liée à leur culture initiée par l'homme il y a plusieurs millénaires, engendrant la création d'hybrides, mais aussi à la complexité de leur système reproducteur impliquant des phénomènes d'auto-incompatibilité, de compatibilité sexuelle intra et inter-genres, mais aussi d'apomixie facultative ou de stérilité (Froelicher *et al.*, 2011). Par ailleurs, des chercheurs ont montré que le greffage interspécifique peut aussi être à l'origine de l'apparition de nouvelles espèces (Nicolosi *et al.*, 2005). Il en résulte une grande confusion ainsi que des controverses quant à la phylogénie et à la taxonomie des agrumes. Or l'analyse de leur diversité génétique est indispensable pour mieux comprendre les mécanismes évolutifs impliqués et pouvoir conduire des programmes d'amélioration variétale (ex : qualités gustatives ou agrumes sans furocoumarines).

De nombreux travaux se sont focalisés sur l'étude de la phylogénie des agrumes et en particulier ceux du genre *Citrus* comprenant la plupart des espèces cultivées. Les premiers travaux étaient basés sur des caractères morphologiques (Scora, 1975 ; Barrett et Rhodes, 1976). Ils ont donné lieu aux deux systèmes de classification des agrumes les plus utilisés aujourd'hui, qui sont ceux de Swingle (Swingle et Reece, 1967) dénombrant 16 variétés d'agrumes du genre *Citrus* et de Tanaka (Tanaka, 1977) en dénombrant 162. Cette grande différence est due à l'élévation de cultivars au rang d'espèces à part entière par Tanaka, dans le cadre de croisements interspécifiques donnant des agrumes ne pouvant pourtant pas se reproduire par fécondation naturelle. Plus récemment, Mabberley a proposé une nouvelle classification des agrumes, prenant mieux en compte la notion d'espèce (Mabberley, 1997). Il regroupe ainsi tous les agrumes vrais (*Citrus*, *Poncirus*, *Fortunella*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* et *Clymenia*) sous un seul nom de genre : *Citrus*. Ainsi, les pomelos et oranges sont par exemple regroupés sous le nom de *Citrus* × *aurantium L.*

Depuis le milieu des années quatre-vingt-dix, de nouveaux outils sont apparus pour étudier les relations phylogénétiques entre les agrumes. Il s'agit des marqueurs moléculaires. Nous pouvons par exemple citer l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD : Federici *et al.*, 1998 ; Nicolosi *et al.*, 2005), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP : Federici *et al.*, 1998), la séquence caractérisée d'une région amplifiée (SCAR : Nicolosi *et al.*, 2000 ; Nicolosi *et al.*, 2005), les analyses d'ADN d'organites (chloroplastes : Nicolosi *et al.*, 2000 ; Nicolosi *et al.*, 2005 ; mitochondries : Froelicher *et al.*, 2011), les microsatellites ou répétitions de séquences simples (SSR : Corazza-Nunes *et al.*, 2002 ; Barkley *et al.*, 2006 ; Garcia-Lor *et al.*, 2013 ; ISSR : Fang *et al.*, 1998).

La phylogénie des agrumes peut également être étudiée *via* l'analyse de profils métaboliques. En effet, de nombreuses études ont pour objectif de déterminer les relations phylogénétiques entre divers organismes, grâce au dosage de certains métabolites secondaires (champignons : Andersen *et al.*, 2008 ; Frisvad *et al.*, 2008 ; plantes : Fraga, 2012). De la même manière, chez les agrumes, la diversité chimique observée par exemple dans les huiles

essentielles extraites des feuilles ou des fruits, permet de retracer les liens de parenté entre différentes variétés (Luro *et al.*, 2012 ; Liu *et al.*, 2013).

2.3.2 Origine génétique des espèces cultivées

Dès le milieu des années soixante-dix, des chercheurs se sont penchés sur l'origine génétique des espèces cultivées d'agrumes. Dans un premier temps, il était admis que les agrumes du genre *Citrus* dérivaient de croisements entre trois taxons ancestraux : les pamplemoussiers (*Citrus maxima*), les mandariniers (*Citrus reticulata*) et les cédratiers (*Citrus medica*) (Scora, 1975 ; Barrett et Rhodes, 1976). Plus récemment, les études phylogénétiques sur les agrumes ont permis l'ajout d'un quatrième taxon représenté par les papedas (*Citrus micrantha*) (Nicolosi *et al.*, 2000 ; Froelicher *et al.*, 2011 ; Garcia-Lor *et al.*, 2013 ; Curk *et al.*, 2015). Ainsi, les hybridations entre ces quatre espèces ancestrales auraient permis de retrouver toute la structuration génétique qui existe aujourd'hui (figure 13).

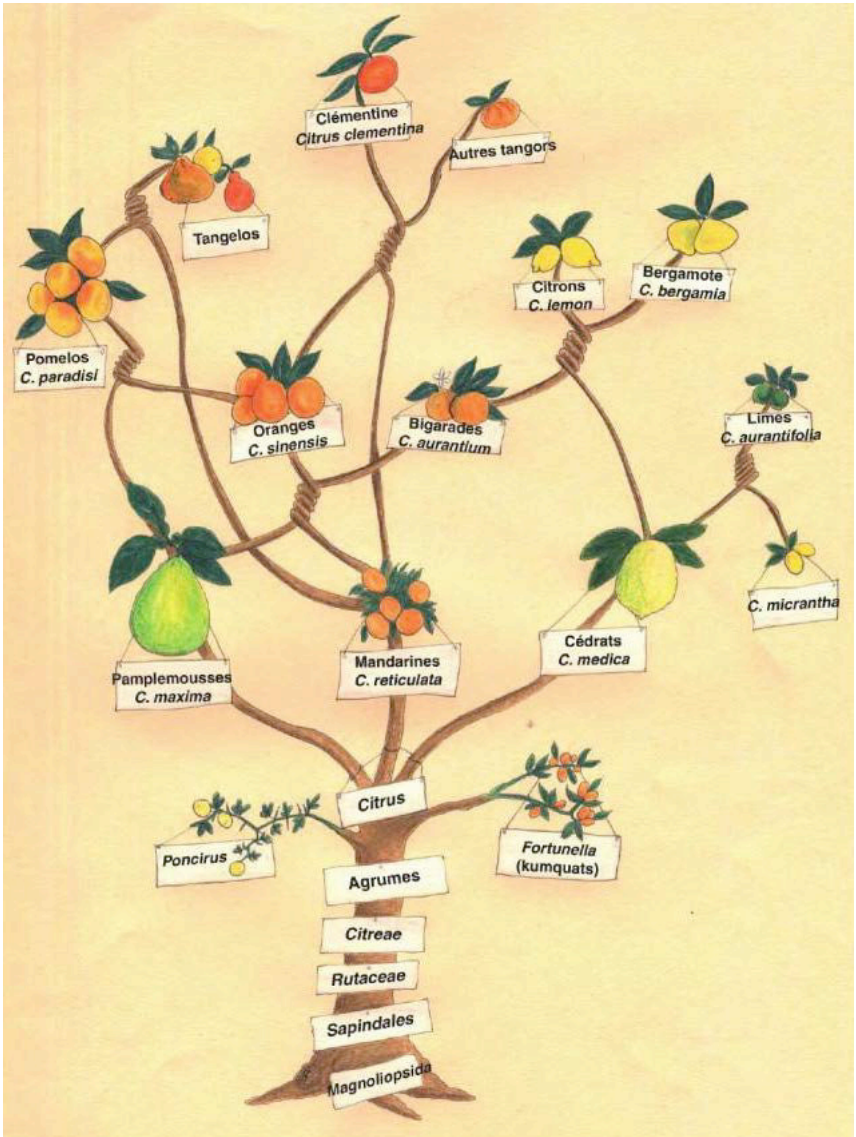


Figure 13. Classification et phylogénie des agrumes (Jacquemond *et al.*, 2013).

L'oranger doux (*Citrus sinensis*) est issu de croisements successifs entre mandarinier et pamplemoussier (Jacquemond *et al.*, 2013). L'oranger amer ou bigaradier (*Citrus aurantium*) est un hybride direct de mandarinier et de pamplemoussier. Dans les deux cas, le pamplemoussier est le géniteur femelle. Le pomelo (*Citrus paradisi*) dérive d'une hybridation entre un oranger doux et un pamplemoussier. Il peut lui-même être croisé avec un mandarinier pour donner les tangelos. Le clémentinier (*Citrus clementina*) est issu d'un croisement entre un oranger doux et un mandarinier, croisement qui donne aussi d'autres tangors. Le citronnier semble dériver d'un croisement entre un oranger amer et un cédratier. En étant lui-même croisé avec un bigaradier, il donnerait le bergamottier (*C. bergamia*). Quant au limettier (*C. aurantifolia*), il provient de l'hybridation d'un cédratier avec un papeda.

2.4 Production, culture, récolte et utilisations des agrumes

2.4.1 Production d'agrumes dans le monde

Aujourd'hui, les agrumes sont cultivés entre les latitudes correspondant au 40ème parallèle nord et au 40ème parallèle sud. Cette zone comprend des régions à climats tropicaux et subtropicaux chauds et pouvant être secs ou humides. On l'appelle la ceinture des agrumes (Chegrani-Conan, 2009).

Les agrumes représentent la première production fruitière mondiale avec plus de 135 millions de tonnes en 2013, répartis comme suit : plus de 71 millions pour les oranges, plus de 28 millions pour les mandarines, plus de 15 millions pour les citrons et limes et plus de 8 millions pour les pomelos (FAO, 2015). La production d'agrumes dépasse ainsi celle des bananes (plus de 106 millions de tonnes), des pommes (près de 81 millions de tonnes) et du raisin (plus de 77 millions de tonnes). Les premiers pays producteurs d'agrumes dans le monde sont dans l'ordre : la Chine (plus de 33 millions de tonnes en 2013, soit environ 24 %), le Brésil (près de 20 millions de tonnes en 2013, soit environ 15 %) et les États-Unis et l'Inde avec chacun plus de 10 millions de tonnes en 2013, soit environ 7 %.

2.4.2 Conditions de culture des agrumes

Les agrumes sont sensibles aux stress abiotiques tels que les vents chauds et secs, le gel, les trop fortes quantités d'eau ou au contraire le manque d'eau (Chegrani-Conan, 2009). Pour prévenir ces agressions, il est nécessaire d'installer des haies brise-vent, un système de drainage (Jacquemond *et al.*, 2013), voire un système d'arrosage lors de la mise en place du verger.

Par ailleurs, les agrumes sont aussi soumis à des stress biotiques tels que les bactéries (chancre bactérien et bactériose des agrumes), les virus (tristeza), les champignons (*mal secco* du citronnier, anthracnose des limes, gommose à Phytophtora), les cochenilles, les pucerons, les teignes, les mouches méditerranéennes des fruits (cératite), les aleurodes (mouches blanches), les mineuses des agrumes, les metcalfa (flatide pruineux), les cicadelles, les thrips,

les fourmis, les acariens ou encore les nématodes (Chegrani-Conan, 2009; Jacquemond *et al.*, 2013) . Il existe différents moyens de lutte contre ces agressions (Jacquemond *et al.*, 2013) :

- l'utilisation de produits chimiques, comme par exemple l'huile blanche pour les cochenilles ou les aleurodes ;
- la lutte biologique comme les lâchés de coccinelles pour les pucerons ou les lâchés de cératites stériles pour entrer en compétition avec les cératites sauvages lors de la reproduction ;
- l'utilisation de plants du genre *Poncirus* en tant que porte-greffe, ce qui confère aux agrumes une résistance à certains parasites comme par exemple les nématodes, le virus de la tristeza et les champignons du genre *Phytophtora* (à l'origine de la gommose).

2.4.3 Récolte des fruits

Les agrumes fructifient généralement à partir du mois de novembre et jusqu'au mois de mai. Ce sont des fruits non climactériques, ce qui signifie qu'aucune phase d'augmentation de la respiration mitochondriale et de la synthèse d'éthylène n'intervient pour déclencher la maturation. Contrairement aux fruits climactériques (ex : banane, pomme, tomate), les agrumes ne peuvent donc plus mûrir après la cueillette. Ils doivent donc impérativement être cueillis à maturité, c'est-à-dire lorsque les taux de sucre, d'acidité et de jus sont optimaux. Il est à noter que la couleur des fruits n'est pas un indicateur de leur maturité. En effet, la dégradation de la chlorophylle présente dans la peau des agrumes s'effectue lors de chocs thermiques dus à l'alternance de journées chaudes et de nuits froides. Suivant les conditions météorologiques, elle peut donc intervenir avant la maturation des fruits (fruits à couleur typique mais non mûrs) ou après (fruits verts mais mûrs). Dans ce dernier cas, les industriels réalisent un processus de déverdissage des agrumes en les gazant à l'éthylène. Cela leur permet d'obtenir des fruits aux couleurs standards attendues par les consommateurs, mais n'améliore en rien leurs qualités gustatives ou nutritionnelles et peut même les entraîner vers un état de sénescence.

2.4.4 Utilisations des agrumes

Les agrumes peuvent être consommés en tant que fruits de bouche ou être transformés en jus et autres produits dérivés. Généralement, les jus sont préparés à partir de fruits présentant des défauts et ne pouvant donc pas être vendus tels quels. C'est ainsi qu'un tiers de la production mondiale d'agrume est transformée (Chegrani-Conan, 2009). Divers produits sont issus de ces transformations tels que les jus de fruits de toutes sortes ou les boissons aux agrumes, les huiles essentielles (utilisées dans les produits pharmaceutiques, cosmétiques ou ménagers), les confitures, les écorces confites, les alcools et la fleur d'oranger. D'autres produits dérivés moins connus sont les huiles aromatisées aux agrumes utilisées dans la cuisine, la pectine des fruits utilisée dans la fabrication de confitures, la pulpe d'agrumes utilisée en tant que coproduit dans l'alimentation des ruminants ou encore le limonène

(composé aromatique) extrait de l'écorce ou des pépins de citron et utilisé dans les solvants industriels.

2.5 Production de coumarines et furocoumarines dans les agrumes

Comme nous l'avons vu précédemment, les agrumes font partie de la famille des Rutacées, plantes qui ont la capacité de produire des coumarines simples et des furocoumarines linéaires (Bourgaud *et al.*, 2006 ; Venugopala *et al.*, 2013). Ces composés ont pu être quantifiés dans différentes variétés et différents tissus chez ces plantes, mais aussi dans les produits dérivés des agrumes. Par exemple, le jus de pomelo contient une coumarine géranylée qui est l'auraptène (Ogawa *et al.*, 2000) et des furocoumarines telles que la bergamottine, l'époxybergamottine et la 6',7'-dihydroxybergamottine (Manthey et Buslig, 2005). Certaines coumarines, comme le citroptène et la 5-géranyloxy-7-métoxycoumarine ont été identifiées dans les huiles essentielles de citron et de bergamote (Dugo *et al.*, 2009). De même, des furocoumarines telles que le bergaptène, l'oxypeucédanine ou la bergamottine ont été mises en évidence dans les huiles essentielles de bergamote, de citron, de pomelo et d'orange amère (Frérot et Decorzant, 2004). Le limoncello et le bergamino, des liqueurs au citron et à la bergamote respectivement, contiennent des coumarines simples telles que le citroptène ou la 5-géranyloxy-7-méthoxycoumarines, mais aussi des furocoumarines comme la bergamottine (Dugo *et al.*, 2009). Une autre étude a permis l'identification d'auraptène dans de la marmelade d'orange douce (Ogawa *et al.*, 2000).

Les agrumes sont réputés pour leurs propriétés bénéfiques sur la santé. En effet, ils contiennent des flavonoïdes permettant de réduire les risques de problèmes cardiovasculaires (Kim *et al.*, 2012) et ayant des propriétés neuroprotectives (Hwang *et al.*, 2012) et antioxydantes (Liu *et al.*, 2012). Mais les furocoumarines présentes dans les agrumes sont aujourd'hui pointées du doigt à cause de leur phototoxicité (ex : lime, Quaak *et al.*, 2012 ; citron, Robl *et al.*, 2013) et de leurs possibles interactions avec certains médicaments (Lin *et al.*, 2012 ; Bailey *et al.*, 2013).

- Concernant la phototoxicité, l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) a publié en 2010 des recommandations quant aux risques liés à l'utilisation d'huiles essentielles dans les cosmétiques (http://ansm.sante.fr). En particulier, les quantités de bergaptène, de xanthotoxine et de trioxysalène dans les crèmes solaires et produits bronzants doivent être inférieures à 1 mg/kg. Ces recommandations ont été adoptées par la Commission de cosmétologie en 2010. Dans ce contexte, les industriels cherchent à éliminer les furocoumarines de leurs produits et l'on trouve aujourd'hui facilement des huiles essentielles d'agrumes dépourvues de ces molécules. L'huile essentielle de bergamote est par exemple obtenue par pression à froid du zeste du fruit puis les furocoumarines en sont éliminées par distillation à la vapeur d'eau (débergapténisation). Mais ces procédés restent tout de même coûteux pour les industriels.
- L'effet pomelo est maintenant beaucoup plus connu que lors de sa découverte dans les années quatre-vingt-dix. Si la consommation mondiale de pomelo (et d'agrumes en général) ne cesse d'augmenter, la tendance est par contre à la baisse dans les pays

développés, où les gens sont de plus en plus informés par leur médecin des interactions jus de pomelo-médicaments (figure 14).

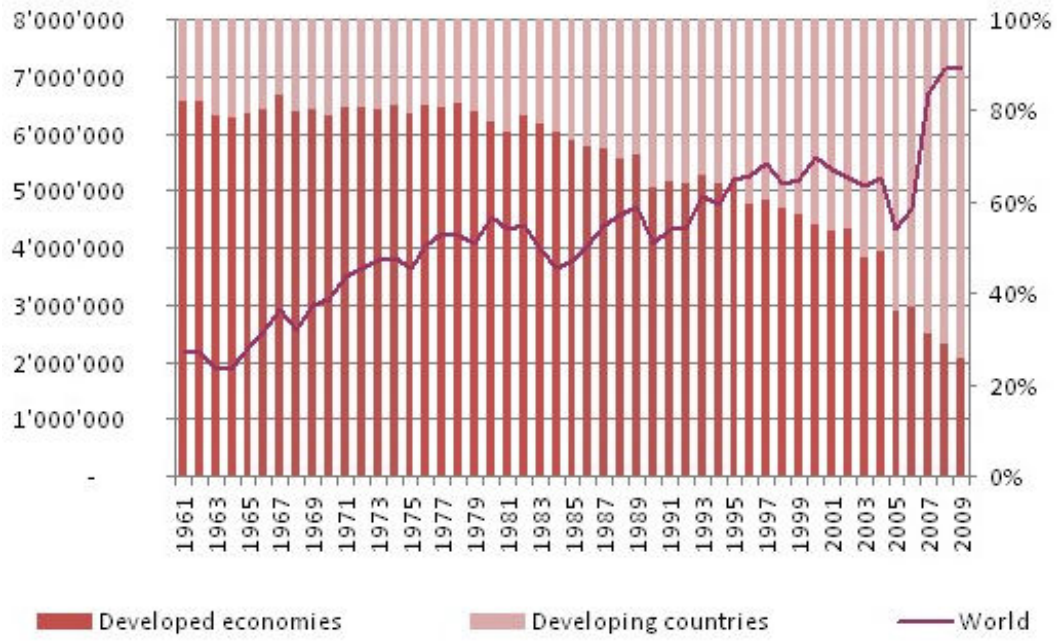


Figure 14. Consommation apparente de pomelos et pamplemousses (en tonnes) entre 1961 et 2010.

Source : secrétariat de la Conférence des Nations Unies sur le Commerce et le Développement (CNUCED) basé sur les statistiques de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (http://www.unctad.info/en/Infocomm/).

3. Présentation des cytochromes P450

3.1 Généralités sur les cytochromes P450

Les cytochromes P450 sont l'une des plus grandes superfamilles de protéines enzymatiques (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). Leur nom de cytochrome provient du fait que ce sont des hémoprotéines, tandis que P signifie « pigment » et que 450 reflète la capacité d'absorption à 450 nm du complexe enzyme-monoxyde de carbone à l'état réduit (Omura and Sato, 1964) .

Ces enzymes sont des monooxygénases (oxydases à fonction mixte) intervenant dans des réactions d'oxydoréduction permettant l'ajout d'un atome d'oxygène à partir d'O_2 sur un substrat, tandis que l'autre atome est réduit en eau (Bernhardt, 2006). Elles catalysent principalement l'hydroxylation de composés, mais peuvent aussi effectuer d'autres réactions telles que des époxidations, des désalkylations, des déshydratations, ou encore des clivages carbone-carbone (figure 15 ; Sono *et al.*, 1996).

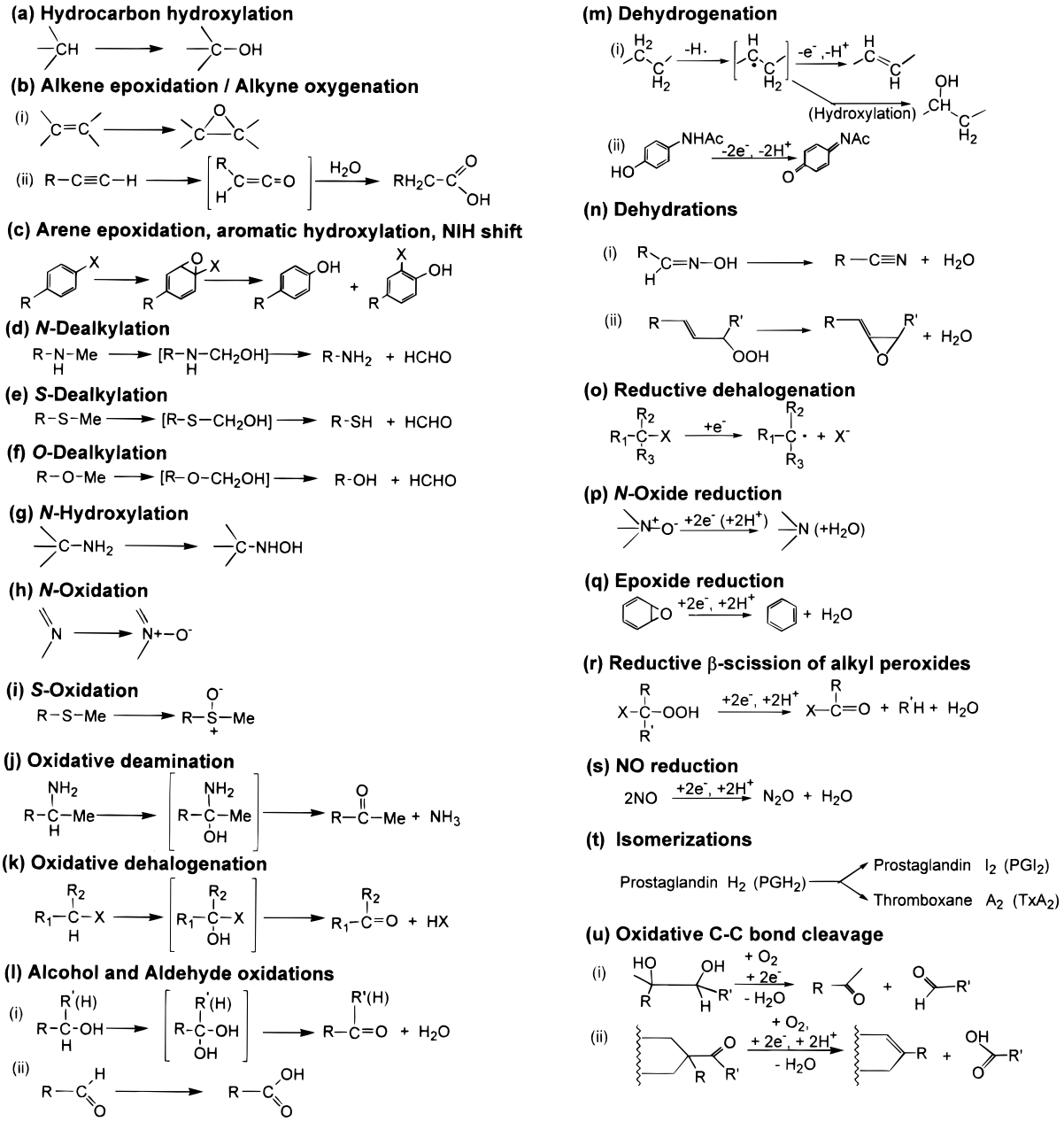


Figure 15. Diversité des réactions catalysées par les cytochromes P450 (Sono *et al.*, 1996).

Pour réaliser ces réactions de monooxygénations, les cytochromes P450 utilisent des électrons fournis soit par du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), soit par du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), selon l'équation suivante (Sono *et al.*, 1996) :

$$\mathbf{RH + O_2 + NAD(P)H + H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NAD(P)^+}$$

Les monooxygénations effectuées par les cytochromes P450 interviennent dans différents phénomènes biologiques. Par exemple, ces enzymes effectuent diverses oxygénations de composés naturels du métabolisme secondaire (Seki *et al.*, 2011 ; Podust and

Sherman, 2012) permettant alors une diversification des molécules, à l'origine de l'adaptation d'un organisme à son environnement (Berenbaum *et al.*, 1991 ; O'Keefe et Harder, 1991). Les cytochromes P450 sont également impliqués dans la détoxication de nombreux xénobiotiques, comme par exemple les médicaments pour l'homme (McDonnell et Dang, 2013) ou les furocoumarines pour certains papillons (Mao *et al.*, 2007).

Les cytochromes P450 sont présents chez tous les êtres vivants, que ce soit des procaryotes (bactéries, archées) ou des eucaryotes (plantes, animaux, champignons) (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). À titre indicatif, Mittapelli et ses collègues ont identifié 296 et 272 cytochromes P450 dans les génomes respectifs de *C. clementina* et de *C. sinensis*, répartis en neuf clans et 43 familles (Mittapelli *et al.*, 2014). Chez les animaux, les P450 sont beaucoup moins nombreux avec par exemple 57 gènes et 58 pseudogènes chez l'homme (Kawashima et Satta, 2014).

3.2 Nomenclature des cytochromes P450

Les cytochromes P450 suivent une nomenclature adoptée par un grand nombre de chercheurs et effectuée par le docteur David Nelson, grâce à des alignements de séquences protéiques (Nelson, 2015). Cette nomenclature est composée des lettres CYP (pour **CY**tochrome **P**450) suivies par un nombre correspondant à la famille (protéines ayant une identité de séquence protéique supérieure à 40 %), lui-même suivi par une lettre pour la sous-famille (dont l'identité de séquence protéique est supérieure à 55 %) et terminé par un nombre pour le gène (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). Les séquences protéiques présentant plus de 97 % d'identité sont considérées comme des variants alléliques. Les cytochromes P450 de plantes sont numérotés CYP51, CYP71 à CYP99 et CYP701 à CYP772 (Nelson, 2015), car des familles de P450 de plantes se sont ajoutées au fur et à mesure du temps, pour atteindre 95 familles aujourd'hui.

Une classification supplémentaire des cytochromes P450 permet de regrouper différentes familles en clans, et cela à partir de la construction d'arbres phylogénétiques. Les clans regroupent des gènes qui ont divergé à partir d'un seul ancêtre commun et sont nommés d'après la famille portant le plus petit numéro dans le clan (ex : le clan 71 contient le premier P450 de plante cloné, le *CYP71A1*) (Nelson, 1999). Par ailleurs, les gènes de cytochromes P450 se distinguent des protéines par une écriture en lettres italiques.

3.3 Diversification des cytochromes P450

Les cytochromes P450 sont des protéines polyphylétiques (homologies non héritées d'un ancêtre commun) et peuvent être classés en deux groupes : les cytochromes P450 de type A, spécifiques des plantes et ceux de type non-A, phylogénétiquement liés à d'autres organismes (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). Le groupe des cytochromes P450 de type A (le plus large) rassemble des enzymes de plantes impliquées dans la synthèse de composés naturels et notamment de métabolites secondaires. Les cytochromes P450 de type non-A présentent souvent des fonctions bien conservées comme par exemple le métabolisme des

stérols ou celui des acides gras. En particulier, la famille CYP51, que l'on retrouve chez tous les êtres vivants, est la plus conservée. Elle est impliquée dans la synthèse des stérols chez les plantes, les champignons, les animaux et les bactéries, chez qui elle catalyse la 14α-déméthylation de stérols (Nelson, 1999 ; Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000).

L'appartenance des cytochromes P450 au groupe de type A ou de type non-A peut être déterminée par l'étude de l'organisation intron-exon des gènes les codant (Paquette *et al.*, 2000). En effet, les séquences codant pour des enzymes de type A possèdent généralement un seul intron bien conservé alors que celles codant pour des enzymes de type non-A se caractérisent par la présence de plusieurs introns. Récemment, Mittapelli et ses collègues ont fait l'hypothèse que le nombre plus élevé de cytochromes P450 de type A chez certains agrumes suggère une expansion rapide de ces gènes dans le génome, en comparaison avec les cytochromes P450 de type non-A (Mittapelli *et al.*, 2014).

La diversification des gènes codant pour des cytochromes P450 passe par le gain ou la perte d'un ou plusieurs introns (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). Chez l'oranger doux et le clémentinier, près de 90 % des gènes codant pour des cytochromes P450 contiennent un ou plusieurs introns, contre environ 10 % qui n'en contiennent pas (Mittapelli *et al.*, 2014). Les chercheurs ont ainsi fait l'hypothèse que les gènes codant pour des cytochromes P450 chez ces *Citrus* dérivent d'un gène ancestral contenant un ou plusieurs introns et que ceux n'en contenant pas sont apparus suite à une perte d'intron(s). Par ailleurs, chez ces mêmes agrumes, on constate une prédominance (70 %) des introns de phase 0 (figure 16), ce qui suggère également que les gènes contenant des introns ont évolué par l'inclusion de segments dans une unité de transcription fonctionnelle (Mittapelli *et al.*, 2014).

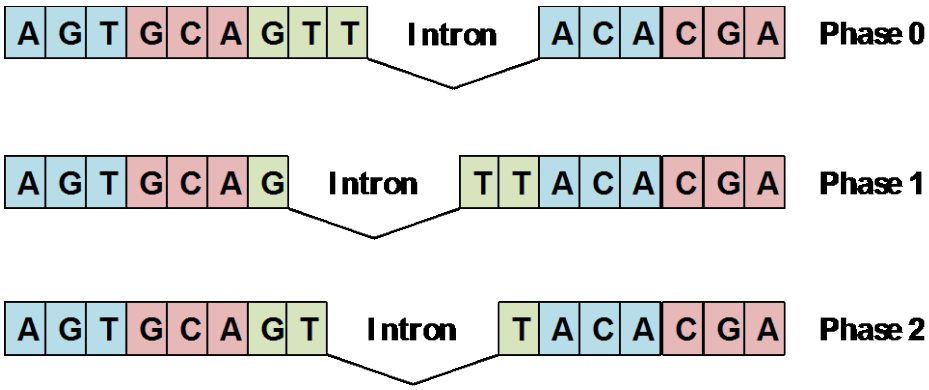


Figure 16. Différentes classes d'introns existantes.

Les introns sont classés en fonction de leur position par rapport au cadre de lecture de la séquence d'un gène.

La diversification des gènes codant pour des cytochromes P450 passe également par des processus de duplications de gènes, d'amplifications, de conversions, de duplications de génome, de perte de gènes et de transferts latéraux ; ces phénomènes pouvant être mis en évidence par des alignements de séquences (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). La duplication de gènes peut être à l'origine d'une pseudogénisation suite à l'apparition de mutations dans les gènes copiés (figure 17). Cette duplication s'effectue *via* la séquence génomique du gène (crossing-over inégal) ou via l'ARN messager (ARNm) issu du gène transcrit (rétroposition : transcription inverse de l'ARNm en ADN complémentaire (ADNc)

puis insertion aléatoire dans le génome) (Podlaha et Zhang, 2001). Dans le premier cas (figure 17-A), le pseudogène formé est dit « non processé » et il est situé près du gène parental dans le génome ; alors que dans le second cas (figure 17-B), le pseudogène est dit « processé » et il est généralement situé loin du gène parental dans le génome (Balakirev et Ayala, 2003 ; Lee, 2014).

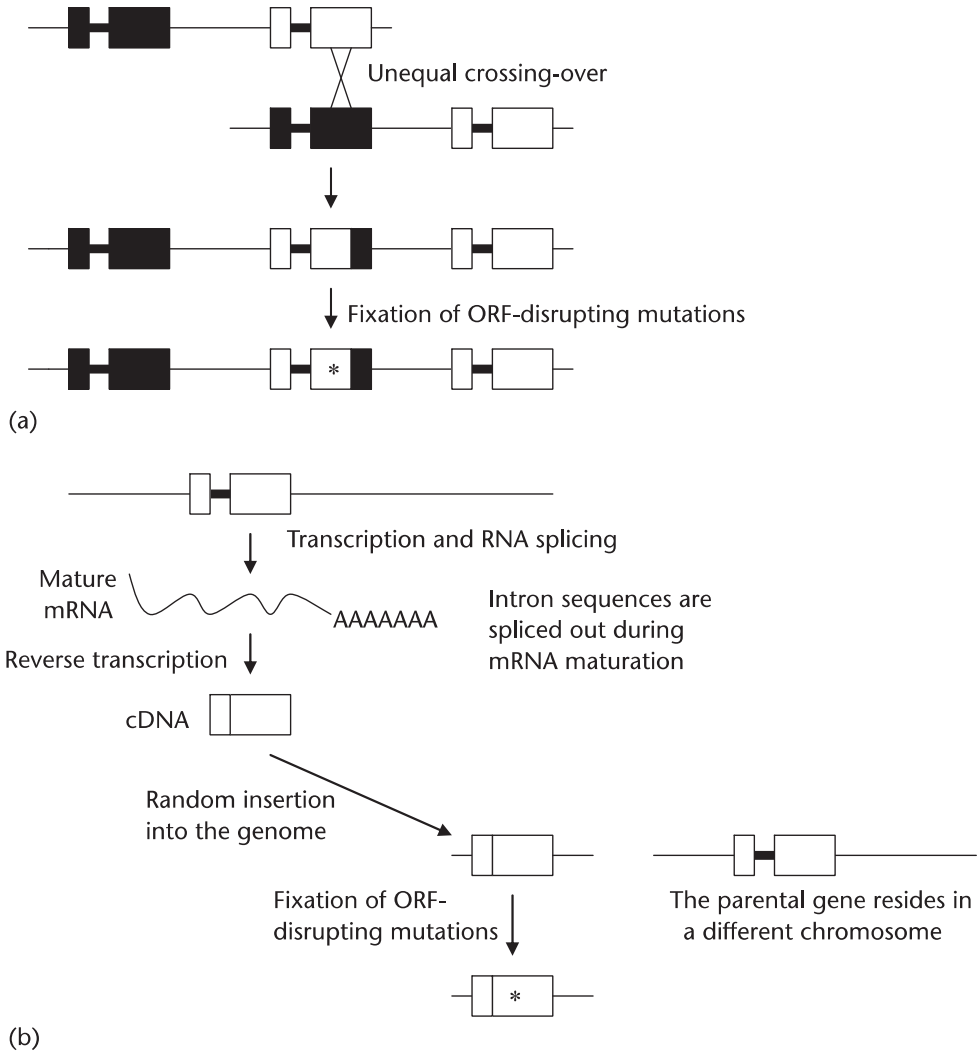


Figure 17. Pseudogénisation liée à la duplication d'un gène (Podlaha and Zhang, 2001).

(a) *Via* la séquence génomique du gène : un crossing-over inégal entraîne la formation d'un gène supplémentaire muni de séquences codantes et non-codantes. (b) *Via* l'ARNm du gène : le gène est transcrit en ARNm, celui-ci subit une maturation, il est rétro-transcrit en ADNc, puis inséré de façon aléatoire dans le génome. Le gène dupliqué n'est formé que d'une séquence codante. Les rectangles et les lignes en gras représentent respectivement les exons et les introns. Les astérisques indiquent l'apparition de mutations dans le gène.

3.4 Structure des cytochromes P450

Comme nous l'avons vu précédemment, les cytochromes P450 sont des hémoprotéines, c'est-à-dire qu'ils sont composés d'une apoprotéine (allant de 45 à 60 kDa) et

d'un groupement prosthétique qui est ici un hème. Ce dernier est constitué d'un noyau protoporphyrine IX composé de quatre cycles pyroles. Au centre de l'hème, un atome de fer forme six liaisons de coordinence : quatre sont effectuées avec le tétrapyrole, une est effectuée *via* le groupement thiolate d'une cystéine de l'apoprotéine et permet de stabiliser l'hème dans le site actif de l'enzyme et une dernière est établie avec une molécule d'eau ou de dioxygène lors du cycle catalytique du cytochrome P450 (figure 18).

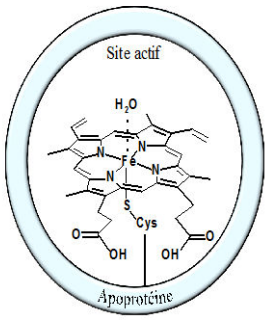


Figure 18. Structure d'un hème de cytochrome P450 (adapté de Groves, 2003).

L'apoprotéine des cytochromes P450 possède une structure composée de quelques domaines plus ou moins conservés et de domaines très variables (figure 19-A et B). L'une des parties les plus conservées se trouve autour de l'hème. Cette région est composée de 6 hélices α (D, E, I, L, J et K), de deux séries de feuillets β et d'une région en structure serpentée appelée le « méandre » et regroupe les domaines conservés suivants (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000) :

- la séquence consensus Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cys-X-Gly qui se trouve au niveau de la face proximale de l'hème juste avant l'hélice L et dont la cystéine se lie au fer de l'hème et permet sa fixation au sein du cytochrome P450 ;
- la séquence absolument conservée Glu-X-X-Arg qui se trouve au niveau de la face proximale de l'hème dans l'hélice K et qui sert probablement à stabiliser le cœur de la protéine ;
- la séquence consensus Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser considérée comme la signature des P450 qui se trouve au milieu de l'hélice I et qui correspond au sillon de transfert de protons vers le côté distal de l'hème.

Les domaines les plus variables des cytochromes P450 concernent la zone d'ancrage de la protéine aux membranes (côté N-terminal) et les zones de reconnaissance et de fixation des substrats (figure 19-A, Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). Ces derniers portent le nom de site de reconnaissance du substrat (SRS) et on en dénombre six distribués le long de la structure primaire des cytochromes P450 (Gotoh, 1992). Ces régions sont déterminantes vis-

à-vis de la spécificité de substrat des cytochromes P450. Par exemple, chez le panais, CYP71AJ3 (psoralène synthase) et CYP71AJ4 (angélicine synthase) présentent une identité de séquence protéique s'élevant à 70 % (Larbat *et al.*, 2009). En revanche, au niveau des SRS, ce chiffre retombe à 40 %, ce qui explique pourquoi ces deux enzymes métabolisent deux substrats différents.

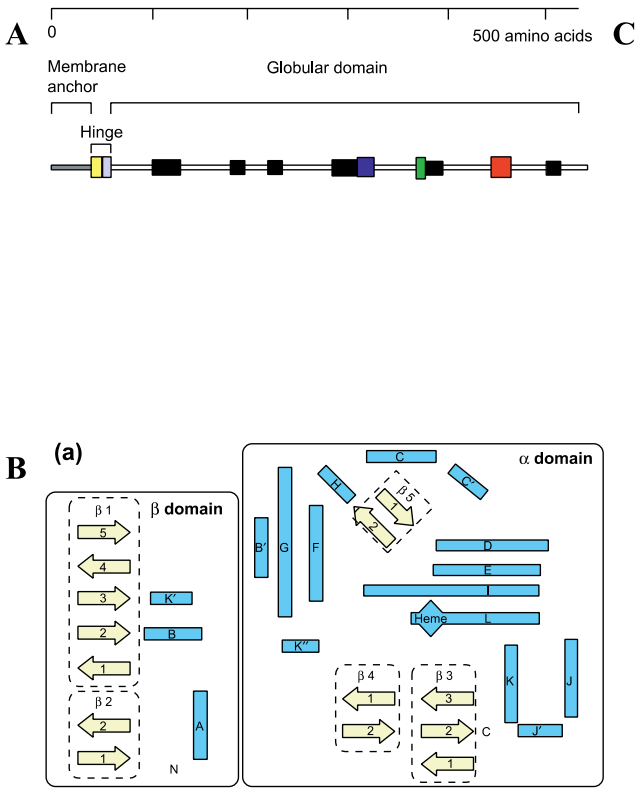


Figure 19. Structure d'un cytochrome P450 (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000).

(A) Structure primaire d'un cytochrome P450 de classe II lié à la membrane du réticulum endoplasmique ; (B) Structure secondaire d'un cytochrome P450 (hélices α en bleu et feuillets β en jaune) ; (C) Structure tertiaire de CYP2C5 associé à la membrane du réticulum endosplasmique (en violet) et à son substrat (en jaune) lié à l'hème (en rouge).

Les cytochromes P450 d'eucaryotes (plantes, animaux, champignons) peuvent être associés aux membranes des réticulums endoplasmiques (figure 19-C), mais certains P450 d'animaux sont aussi présents dans la membrane interne des mitochondries (Williams *et al.*, 2000). Chez les plantes, certains cytochromes P450 peuvent aussi être localisés au niveau des membranes plastidiales (Hughes *et al.*, 2009). Quant aux P450 de procaryotes, ce sont des enzymes solubles (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). Généralement, les cytochromes P450 eucaryotes possèdent un groupe de prolines (Pro-Pro-X-Pro) précédé de quelques acides aminés basiques et formant une charnière entre la zone d'ancrage à la membrane (côté N-terminal) et la partie globulaire de la protéine (figure 19-A, Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000).

La détermination de la structure des cytochromes P450 est très utile pour mieux connaître leur fonctionnement. Pour cela, de nombreux chercheurs ont effectué la cristallisation de ces enzymes en présence ou absence de leur substrat. Une étude a ainsi pu

mettre en évidence plusieurs entrées et sorties possibles pour les substrats et produits de CYP2C5 de lapin (Williams *et al.*, 2000). Le tunnel formé par la boucle F-G et le feuillet β en N-terminal, constitue une première voie d'accès située au niveau de l'attache membranaire et permettrait le passage des substrats lipophiles. Au contraire, les métabolites hydrophiles pourraient passer par une entrée formée par la boucle B-C et les hélices G et I. Par ailleurs, il a été montré que lors de la fixation du substrat dans le site actif d'un cytochrome P450 (hydroxylase d'acide gras) de *Bacillus megaterium*, des changements de conformation de la protéine s'effectuaient (Li et Poulos, 1997). Les domaines bougeant le plus sont les hélices F et G et la boucle les reliant qui entraînent avec elles un léger mouvement dans les structures alentours (boucle liant les hélices G et H, hélice H, feuillets β entre les hélices H et I, région N-terminale de l'hélice I). Ces changements permettent de refermer le tunnel d'accès du substrat après sa fixation dans le site actif. Certains chercheurs ont également cristallisé des cytochromes P450 de plantes, comme cela a été fait pour CYP74A2 de *Parthenium argentatum* (ou guayule, plante originaire du Mexique). La structure cristalline réalisée, a ainsi mis en évidence un mode de fixation de l'hème différent chez cette enzyme atypique, qui est auto-suffisante et ne nécessite pas de NADPH réductase, ni de dioxygène (Li *et al.*, 2008).

3.5 Mécanisme réactionnel des cytochromes P450

3.5.1 Origine du pouvoir réducteur

Les cytochromes P450 sont divisés en quatre classes (figure 20) en fonction de la manière dont les électrons provenant du NAD(P)H sont fournis à l'enzyme (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000) :

1. Les P450 de la classe I fonctionnent en partenariat avec une ferrodoxine réductase (FdR) contenant un domaine flavine adénine dinucléotide (FAD) qui fournit les électrons à une ferrédoxine fer-soufre (Fdx) qui elle-même transmet les électrons au P450 (Sono *et al.*, 1996). On retrouve ces P450 chez les procaryotes (formes solubles), dans les membranes mitochondriales des animaux, mais aucun n'a été identifié chez les plantes pour le moment (figure 20-A).
2. Les P450 de la classe II reçoivent directement les électrons d'une cytochrome P450 réductase (CPR) fusionnée à l'enzyme et contenant des domaines FAD et flavine mononucléotide (FMN). On les retrouve chez tous les eucaryotes, principalement dans les membranes du réticulum endoplasmique (figure 20-B), mais aussi sous forme soluble chez les bactéries.
3. Les P450 de la classe III sont « auto-suffisants », c'est-à-dire qu'ils ne nécessitent pas de donneurs d'électrons. On les trouve chez les mammifères ou dans les membranes plastidiales des plantes.
4. Les P450 de la classe IV reçoivent directement les électrons du NAD(P)H. À ce jour, un seul a pu être décrit ; il s'agit d'un P450 soluble de champignon qui réduit le NO en N_2O.

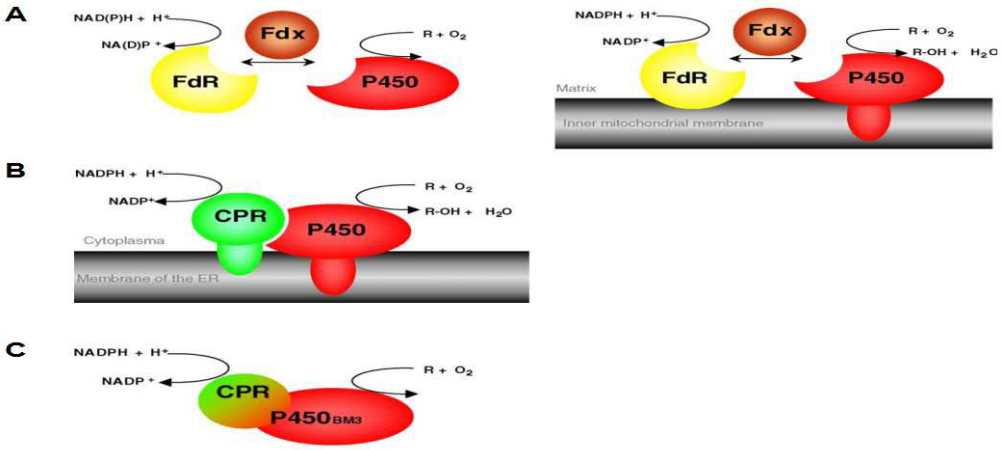


Figure 20. Classification des cytochromes P450 en fonction de l'origine du pouvoir réducteur (Bernhardt, 2006).

(A) Classe I, soluble (à gauche) ou mitochondrial (à droite) ; (B) Classe II, associé à la membrane du réticulum endoplasmique.

3.5.2 Cycle catalytique

La plupart des cytochromes P450 fonctionnent selon un même cycle catalytique bien connu aujourd'hui (figure 21, Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). Au repos, le fer de l'hème du cytochrome P450 est sous forme d'ion ferrique (Fe^{3+}) et partiellement lié à une molécule d'eau. Lors de la fixation du substrat, l'eau est évacuée (étape 1). Ensuite, le fer du complexe est réduit par l'arrivée d'un électron ; il se trouve donc sous la forme d'ion ferreux (Fe^{2+}) (étape 2). La troisième étape correspond à la fixation d'une molécule de dioxygène au fer de l'hème pour former un complexe superoxidé ($Fe^{3+}O_2$) qui est ensuite réduit par l'arrivée d'un second électron, formant alors un dérivé réactif de l'oxygène. Par la suite, l'arrivée de deux protons successifs permet de former les complexes peroxo-ferrique [B] et ferryl-oxo [C] et d'évacuer une molécule d'eau. L'atome d'oxygène est finalement transféré au substrat et l'arrivée d'une molécule d'eau permet l'évacuation du produit du site actif qui est alors de nouveau opérationnel.

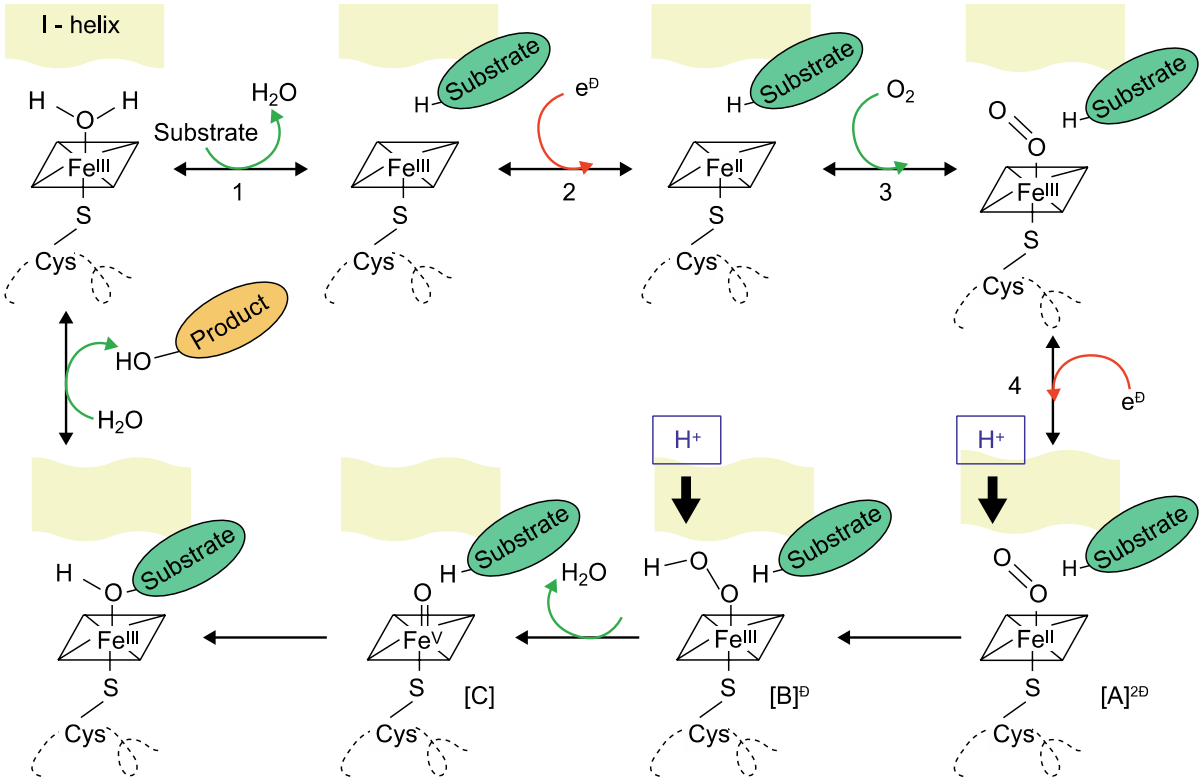


Figure 21. Cycle catalytique des cytochromes P450 (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000).

3.6 Rôles des cytochromes P450

3.6.1 Biosynthèse de composés naturels

Les cytochromes P450 sont présents chez tous les êtres vivants et peuvent avoir des rôles très variés. Chez les mammifères, ils sont par exemple impliqués dans la synthèse des hormones stéroïdiennes, de la vitamine D3, du cholestérol, des acides biliaires ou encore des prostaglandines (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000 ; Kawashima et Satta, 2014). Certains cytochromes P450 de champignons permettent la synthèse de stérols et de mycotoxines, mais aussi le métabolisme des lipides (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). Chez les procaryotes, les cytochromes P450 interviennent par exemple dans le métabolisme des acides gras, le catabolisme de sources carbonées ou encore dans la synthèse d'antibiotiques (O'Keefe et Harder, 1991 ; Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). Cependant, l'absence de cytochromes P450 chez certaines bactéries comme *E. coli*, suggère qu'ils n'ont pas un rôle essentiel chez les procaryotes (Kawashima et Satta, 2014).

Certains de ces organismes peuvent être utilisés dans le domaine de l'ingénierie métabolique pour produire des molécules d'intérêt. Une étude récente montre ainsi la production semi-synthétique d'artémisinine, une molécule utilisée dans les médicaments antipaludiques, *via* la production hétérologue de CYP71AV1 chez la levure (pour revue voir Renault *et al.*, 2014). De la même manière, des chercheurs ont récemment optimisé la production de coumarines chez *E. coli* (Yang *et al.*, 2015).

Parmi tous les organismes, ce sont les plantes qui contiennent le plus grand nombre de cytochromes P450. Concernant la biosynthèse de composés naturels chez les végétaux, les familles de P450 peuvent être rangées en quatre classes de réactions/voies de biosynthèse métaboliques (Mizutani et Ohta, 2010) :

1. les réactions essentielles conservées dans le règne végétal ;
2. les réactions/voies de biosynthèse basiques conservées chez toutes les plantes terrestres ;
3. les réactions/voies de biosynthèse essentielles ayant émergé pendant l'évolution des plantes à fleurs ;
4. les réactions/voies de biosynthèse spécialisées propres à chaque espèce végétale.

Les familles de cytochromes P450 appartenant à la première classe sont CYP51, CYP710 et CYP97, que l'on retrouve aussi bien chez les algues vertes que chez les plantes vasculaires (Mizutani et Ohta, 2010). Les enzymes appartenant aux familles CYP51 et CYP710 sont impliquées dans la voie de biosynthèse des stérols (Nelson, 1999 ; Morikawa *et al.*, 2006) et celles appartenant aux familles CYP97 interviennent dans la production de xanthophylles ayant un rôle de collecteur de lumière et de photoprotection (Kim et DellaPenna, 2006).

Les plantes terrestres ont dû mettre un place un système de protection de leurs tissus contre la dessiccation, les rayonnements UV et les attaques de pathogènes et d'herbivores. Ce système de protection implique entre autres les cytochromes P450 de la deuxième classe, qui interviennent dans l'hydroxylation de composés de défense ou structuraux (ex : cinnamates, acides gras). L'hydroxylation des cinnamates fait intervenir différentes familles de cytochromes P450 (CYP73A, CYP98A, CYP84A et CYP788A) en fonction de la position du groupement hydroxyle ajouté (Mizutani et Ohta, 2010). La *para*-hydroxylation de l'acide cinnamique en acide *p*-coumarique (CYP73A : Teutsch *et al.*, 1993 ; Gravot *et al.*, 2004), est une étape clé dans la synthèse de nombreux phénylpropanoïdes. Ces derniers interviennent par exemple dans la protection contre les UV (flavonoïdes : Kaneko *et al.*, 2003), dans la structure de la plante (monolignols : Lin *et al.*, 2015) ou encore dans la défense de la plante (stilbènes : Eckermann *et al.*, 2003 ; coumarines et furocoumarines : Bourgaud *et al.*, 2006). L'hydroxylation des acides gras, nécessaire à la synthèse de polymères tels que la cutine ou la subérine, fait intervenir les cytochromes P450 appartenant à la famille CYP86 (Mizutani et Ohta, 2010).

Les cytochromes P450 de la troisième classe sont impliqués dans la synthèse ou le catabolisme de phytohormones telles que les auxines, l'acide abscissique, les cytokinines, les oxylipines, les gibbérellines, les brassinostéroïdes ou les strigolactones (Mizutani et Ohta, 2010). Par exemple, chez le riz, les enzymes de la famille CYP735A interviennent dans la synthèse de cytokinines (Maruyama *et al.*, 2014). Chez l'arachide, CYP707A hydroxyle l'acide abscissique en position 8', une étape majeure dans le catabolisme de cette hormone (Liu *et al.*, 2014).

Certaines plantes sont spécialisées dans la synthèse de composés naturels spécifiques, faisant alors intervenir les cytochromes P450 de la quatrième classe. Par exemple, les enzymes de la famille CYP725 ne sont présentes que chez les plantes du genre *Taxus* et sont spécialisées dans la synthèse du taxol, un agent anticancéreux (Mizutani et Ohta, 2010). De la même manière, les glucosinolates sont des molécules que l'on retrouve principalement chez

des familles de plantes appartenant à l'ordre des Brassicales. Leur synthèse fait notamment intervenir les cytochromes P450 de la famille CYP81F (Wiesner *et al.*, 2014).

Aujourd'hui, les fonctions d'une grande majorité de cytochromes P450 restent inconnues. Cependant, les outils de bioinformatique, de métabolomique et de transcriptomique dont nous disposons s'avèrent très utile dans l'identification de nouvelles activités enzymatiques.

3.6.2 Détoxification de composés exogènes

Certains cytochromes P450 permettent la détoxification de composés exogènes, fonction qui semble conditionnée par les facteurs environnementaux et qui évolue rapidement chez les êtres vivants (Kawashima et Satta, 2014). Cette évolution se produit principalement au niveau des SRS des P450, ce qui permettrait aux organismes de pouvoir faire face à un nombre croissant de xénobiotiques (Gotoh, 1992).

Cette capacité de détoxification de xénobiotiques se retrouve chez tous les êtres vivants. Ainsi, les procaryotes et les champignons seraient capables de cataboliser certains xénobiotiques (Werck-Reichhart et Feyereisen, 2000). De même, chez l'homme, certains P450 sont impliqués dans la détoxification d'alcaloïdes, de composés aromatiques, d'acides gras (Kawashima et Satta, 2014), mais aussi de médicaments (McDonnell et Dang, 2013). Chez les plantes, la détoxification de composés exogènes tels que des herbicides (Höfer *et al.*, 2014) confère à la plante une résistance à certains produits phytosanitaires, ce qui impacte fortement l'agriculure moderne.

3.7 Cytochromes P450 et coumarines et furocoumarines

Les cytochromes P450 et les coumarines et furocoumarines peuvent interagir de différentes manières : les furocoumarines peuvent être à l'origine de l'inactivation de certaines enzymes ; au contraire, certains P450 peuvent détoxifier les furocoumarines ; enfin certains cytochromes P450 interviennent dans la voie de biosynthèse des coumarines et des furocoumarines. Ce dernier point ne sera pas traité dans cette partie, étant donné que j'ai déjà décrit la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines précédemment.

3.7.1 Inactivation autocatalytique des P450 par les furocoumarines

Certaines furocoumarines sont des inhibiteurs autocatalytiques (ou Mechanism-Based Inactivators MIBs) de P450. Par exemple, la bergamottine est un MIB du CYP3A4 présent dans les intestins et le foie de l'homme, aboutissant alors à l'effet pomelo (Lin *et al.*, 2012). Le bergaptène et la xanthotoxine peuvent également inhiber les CYP6P7 et CYP6AA3 de moustique (Duangkaew *et al.*, 2011). Une démonstration de l'inactivation de cytochromes P450 de plantes par des furocoumarines, a été effectuée au sein de notre laboratoire. Cette étude a montré que les C4H de *R. graveolens* (CYP73A32), de *P. crispum* (CYP73A10)

(productrices de furocoumarines) et d'*Helianthus tuberosus* (CYP73A1) (non productrice de furocoumarines), sont inactivées de manière irréversible par le psoralène et la xanthotoxine (Gravot *et al.*, 2004). En revanche, cette inhibition est beaucoup moins forte chez les plantes productrices de furocoumarines que chez celle qui n'en produit pas. Ainsi, l'évolution des C4H de rue et de persil s'est faite de sorte à ce qu'elles puissent fonctionner correctement dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, même en présence de furocoumarines.

3.7.2 Détoxification de furocoumarines par des P450 et coévolution

Comme nous l'avons vu précédemment, les furocoumarines sont des composés allélopathiques permettant à la plante de se défendre contre les attaques d'herbivores. En conséquence, seuls les prédateurs mettant en place un système de défense contre ces furocoumarines peuvent se nourrir de plantes qui en contiennent. C'est par exemple le cas du papillon du céleri (*Papilio polyxenes*) qui possède des cytochromes P450 étant capables de métaboliser certaines furocoumarines comme la xanthotoxine, le bergaptène et l'angélicine et qui peut donc se nourrir de plantes en accumulant (Berenbaum et Zangerl, 1993). Chez ce papillon, le cytochrome P450 CYP6B1 est induit en présence de xanthotoxine durant le stade larvaire, lorsque l'insecte se nourrit de feuilles de persil (Harrison *et al.*, 2001). En revanche, aux stades « œuf » ou « adulte », le niveau d'expression de cette enzyme n'est pas détectable, car à ces moments-là, l'insecte ne se nourrit pas de feuilles contenant des furocoumarines. De la même manière, la chenille *Depressaria pastinacella*, qui se nourrit de feuilles de panais, voit l'expression de son CYP6AB3 induite par la présence de furocoumarines, ce qui prouve la détoxification de ces composés (Li *et al.*, 2004). En dehors de ces phénomènes d'induction, une autre étude a montré que la diversification des cytochromes P450 de la famille CYP6B des papilionidés, était liée au régime herbivore de ces insectes. Plus précisément, il semble que les espèces polyphages devaient posséder des enzymes CYP6B capables de métaboliser un grand nombre de substrats, alors qu'aujourd'hui, les espèces oligophages se nourrissant exclusivement sur des plantes à furocoumarines, possèdent des enzymes CYP6B hautement spécifiques et efficaces (Li *et al.*, 2003).

Les insectes évoluent donc de manière à pouvoir se nourrir sur de nouveaux hôtes, tandis que les plantes évoluent également de sorte à pouvoir se défendre contre les herbivores (Scott *et al.*, 1998). On emploie alors le terme de coévolution. *P. polyxenes* métabolise des furocoumarines *via* les cytochromes P450 de la famille CYP6B qui montrent une activité plus importante pour les furocoumarines linéaires (ex : xanthotoxine, bergaptène, isopimpinelline) que pour les formes angulaires (ex : angélicine, sphondine) (Berenbaum et Zangerl, 1993 ; Berenbaum et Zangerl, 1998 ; Wen *et al.*, 2003). Selon Wen et ses collègues, cette capacité de métabolisation de furocoumarines linéaires et angulaires aurait permis à *P. polyxenes* de coloniser les plantes de la famille des Apiacées, tandis que les ancêtres du genre *Papilio* se nourrissant de Rutacées n'avaient jamais dû faire face à des furocoumarines angulaires (Wen *et al.*, 2003). Par ailleurs, ces composés angulaires sont assez peu répandus et à ma connaissance, aucune plante n'est capable de ne produire que des furocoumarines angulaires. C'est ainsi qu'a été émis l'hypothèse que les furocoumarines angulaires sont apparues après

les linéaires, dans le but de lutter contre les insectes herbivores ayant la capacité de métaboliser les furocoumarines linéaires (Berenbaum et Zangerl, 1998).

4. Objectifs de la thèse

Les coumarines et furocoumarines présentent des aspects bénéfiques mais aussi délétères pour l'homme. En particulier, les furocoumarines présentes dans les agrumes sont à l'origine de l'effet pomelo qui, depuis qu'il a été découvert dans les années quatre-vingt-dix, a entraîné une forte chute de la consommation de pomelo dans les pays développés. Pourtant, ces fruits produisent d'autres composés ayant des bienfaits sur la santé. Ils sont notamment riches en vitamines, en fibres et en flavonoïdes, des métabolites secondaires réputés pour leur rôle antioxydant. Par ailleurs, la phototoxicité des furocoumarines oblige les industriels à les éliminer de leurs huiles essentielles utilisées par exemple dans les produits cosmétiques à base d'agrumes. Ces composés ont donc un impact économique fort, que ce soit au niveau de l'alimentation ou de l'industrie cosmétique.

Au Laboratoire Agronomie et Environnement (LAE), la thématique des furocoumarines est étudiée depuis 1998. Dans les premiers temps, les recherches se focalisaient sur l'aspect agronomique de ces molécules, c'est-à-dire la détermination des plantes productrices ou encore l'optimisation de leur synthèse (Milesi, 2001 ; Massot, 2001). Par la suite, les recherches se sont tournées sur l'aspect moléculaire de la production des furocoumarines, à savoir la caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans leur voie de biosynthèse. Les travaux portent sur des enzymes de la famille des dioxygénases (Vialart *et al.*, 2012), des prényltransférases (Karamat *et al.*, 2014), mais surtout des cytochromes P450 (Gravot *et al.*, 2004 ; Larbat *et al.*, 2007 ; Larbat *et al.*, 2009 ; Krieger, 2014) qui sont les enzymes les plus représentées dans la voie de biosynthèse des furocoumarines. La plupart de ces enzymes ont déjà été caractérisées chez les Apiacées (essentiellement chez le panais). En revanche, la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les Rutacées reste très peu connue et en particulier les cytochromes P450 intervenant chez les agrumes.

L'objectif principal au cours de mon doctorat était d'identifier et de caractériser fonctionnellement des cytochromes P450 impliqués dans la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes. Pour cela, nous avons mis en place une stratégie qui consistait tout d'abord à identifier et quantifier des coumarines et furocoumarines chez différentes variétés d'agrumes, pour éventuellement mettre en évidence des variétés plus productrices que d'autres. Par la suite, nous voulions rechercher des gènes candidats à la synthèse de coumarines et/ou furocoumarines dans des banques d'ADNc d'agrumes en se basant sur des homologies de séquences avec les gènes déjà caractérisés dans la bibliographie. Afin de limiter le nombre de gènes candidats à tester, l'intérêt de l'identification de variétés d'agrumes faiblement ou fortement productrices de composés était de déterminer le niveau d'expression de ces gènes chez ces différentes espèces. Nous espérions ainsi mettre en évidence un plus fort niveau d'expression de certains gènes chez des variétés d'agrumes plus productrices de coumarines et furocoumarines. Pour finir, nous avons décidé de cloner les gènes qui nous paraissaient être de bons candidats, pour pouvoir éventuellement caractériser leur fonction. Ainsi, mon travail de doctorat s'est déroulé en trois points :

1. La première partie de mon travail consistait à mettre au point et optimiser une méthode d'analyse de coumarines et furocoumarines chez les agrumes par chromatographie liquide à très haute performance couplée à de la spectrométrie de masse (UPLC-MS). Le chapitre 1 de la partie « Résultats et discussion » revient sur ce travail.
2. Une fois la méthode créée, je l'ai utilisé afin d'identifier et de quantifier des coumarines et furocoumarines chez différentes espèces d'agrumes pour éventuellement mettre en évidence des variétés faiblement et fortement productrices de composés. Je récapitule ce point dans le chapitre 2 de la partie « Résultats et discussion ».
3. Finalement, le dernier point de mon travail consistait à identifier des gènes candidats pour la synthèse de coumarines et/ou de furocoumarines chez les agrumes puis de tester leur activité, pour pouvoir éventuellement mettre en évidence une fonction dans la voie de biosynthèse de ces composés. Je décris ce travail dans le chapitre 3 de la partie « Résultats et discussion ».

À long terme, l'objectif de ce travail est de fournir des pistes quant à l'amélioration de variétés d'agrumes par l'obtention de fruits ne produisant que très peu, voire pas de furocoumarines du tout. Ce travail devra en parallèle se pencher sur l'impact de l'absence de ces molécules quant à la défense de la plante contre les ravageurs. Dans tous les cas, il pourrait permettre de faire repartir la consommation déclinante d'agrumes (et en particulier de pomelos et pamplemousses), mais aussi de faciliter la production de cosmétiques contenant des extraits d'agrumes.

Chapitre II :
Matériel et méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Matériel utilisé

1.1 Matériel végétal : agrumes

Les agrumes utilisés au cours de ma thèse proviennent de trois lieux différents (tableau 2). Pour la plupart d'entre eux, je les ai récoltés à la Station de Recherche Agronomique INRA/CIRAD de San Giuliano en Corse, au travers d'une collaboration établie entre le LAE et le groupe de Yann Froelicher (Unité Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes méditerranéennes et tropicales, AGAP, CIRAD). Cette station possède l'une des plus grandes collections d'agrumes en Europe. Le verger, qui s'étend sur 13 hectares, comporte plus de 1000 variétés d'agrumes différentes, soit près de 5000 arbres et arbustes avec un changement de variété tous les trois, quatre ou cinq arbres. Les fruits de la variété d'agrume *C. micrantha* proviennent de la pépinière Bachès à Eus, près de Perpignan. Ils ont été cultivés sous serre et ont été récoltés par Yann Froelicher. Enfin, j'ai aussi effectué des prélèvements de fruits sur des variétés d'agrumes provenant du jardin botanique du Montet à Villers-Lès-Nancy. Les arbustes, plantés dans de gros pots, sont sortis en extérieur après les saints de glace (généralement vers le 19 mai) et sont remis dans les serres tropicales vers le 15 octobre en fonction du froid.

Concernant les prélèvements, les fruits et/ou feuilles ont été cueillis le matin, sur la face de l'arbre exposée au soleil et en périphérie de la frondaison, dans le but de limiter les variations dues à des conditions environnementales non contrôlées. Généralement, pour les variétés d'agrumes provenant de San Giuliano et d'Eus, 5 fruits ont pu être récoltés sur chaque arbre. En revanche, les agrumes du jardin botanique de Villers-Lès-Nancy étant plus petits et moins fournis, je n'ai pu récolter que 3 fruits par arbre. Pour mes expérimentations, les fruits provenant de San Giuliano et d'Eus ont été cueillis à maturité, tandis que ceux provenant de Villers-Lès-Nancy ont été prélevés à différents stades de maturité (jeunes fruits, fruits à un stade intermédiaire et fruits mûrs).

1.2 Souches bactériennes

1.2.1 *E. coli* GeneHogs®

La souche *E. coli* GeneHogs® provient de chez Invitrogen™ et dérive de la souche *E. coli* DH10™. Ces bactéries sont rendues électrocompétentes au laboratoire (cf. protocole en annexe 2), puis elles sont stockées sous forme de stocks glycérol au congélateur à -80 °C. Cette souche permet une transformation rapide et efficace ainsi que l'amplification de plasmides recombinants de grande taille. Son génotype est le suivant : F$^-$ *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G *fhu*A::IS2.

Nom du cultivar	Système de classification de Swingle	Système de classification de Tanaka	N° d'identification	Situation géographique
Lime mexicaine	*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.	*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.	SRA140	SRA de San Giuliano
Lime Gallet	*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.	*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.	SRA1057	SRA de San Giuliano
Lime Gallet	*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.	*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.	2005.3.091	Jardin Botanique du Montet
Lime Giant Key	*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.	*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.	SRA785	SRA de San Giuliano
Lime Coppenrhad	*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.	*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.	SRA838	SRA de San Giuliano
Bergamote Castagnaro	*C. aurantifolia* var Bergamia	*C. bergamia* Risso and Poit.	SRA612	SRA de San Giuliano
Papeda Excelsa	*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.	*C. excelsa* Wester	SRA110234	SRA de San Giuliano
Lime de Tahiti	*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.	*C. latifolia* (Yu. Tan.) Tan.	SRA58	SRA de San Giuliano
Lime Bears	*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.	*C. latifolia* (Yu. Tan.) Tan.	SRA616	SRA de San Giuliano
Lime douce du Brésil	*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.	*C. limettioides* Tan.	SRA697	SRA de San Giuliano
Lime douce de Palestine	*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.	*C. limettioides* Tan.	SRA802	SRA de San Giuliano
Papeda Alemow	*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.	*C. macrophylla* Wester	SRA779	SRA de San Giuliano
Orange amère du Maroc	*C. aurantium* L.	*C. aurantium* L.	SRA122	SRA de San Giuliano
Orange amère Bouquettier de Nice	*C. aurantium* L.	*C. aurantium* L.	SRA952	SRA de San Giuliano
Orange amère Granito	*C. aurantium* L.	*C. aurantium* L.	SRA870	SRA de San Giuliano
Orange amère Chinotto	*C. aurantium* L.	*C. myrtifolia* Raf.	SRA752	SRA de San Giuliano
Bigarade - Cultivar inconnu	*C. aurantium* L.	*C. aurantium* L.	2005.3.073	Jardin Botanique du Montet
Papeda Mountain	*C. halimii* B.C. Stone (Tan. Class.)	*C. halimii* B.C. Stone	SRA110302	SRA de San Giuliano
Papeda Combava	*C. hystrix* D.C.	*C. hystrix* D.C.	SRA630	SRA de San Giuliano
Papeda Combava	*C. hystrix* D.C.	*C. hystrix* D.C.	2005.3.090	Jardin Botanique du Montet
Papeda Yuzu	*C. ichang austera* ex. Tan. hybrid	*C. junos* Siebold	SRA846	SRA de San Giuliano
Papeda Ichang	*C. ichangensis* Swing.	*C. ichangensis* Swing.	SRA686	SRA de San Giuliano
Papeda Khasi	*C. latipes* (Swing.) Tan.	*C. latipes* (Swing.) Tan.	SRA844	SRA de San Giuliano
Citron acide Rough	*C. limon* (L.) Burm. f.	*C. jambhiri* Lush.	SRA778	SRA de San Giuliano
Limonette de Marrakech	*C. limon* (L.) Burm. f.	*C. limetta* Risso	SRA829	SRA de San Giuliano
Citron Eureka	*C. limon* (L.) Burm. f.	*C. limon* (L.) Burm. f.	SRA2	SRA de San Giuliano
Citron Meyer	*C. limon* (L.) Burm. f.	*C. limon* (L.) Burm. f.	SRA292	SRA de San Giuliano
Lime Rangpur	*C. limon* (L.) Burm. f.	*C. limonia* Osbeck	SRA110050	SRA de San Giuliano
Lime Rangpur jaune	*C. limon* (L.) Burm. f.	*C. limonia* Osbeck	SRA944	SRA de San Giuliano
Citron acide Volkamer	*C. limon* (L.) Burm. f.	*C. limonia* Osbeck	SRA729	SRA de San Giuliano
Pamplemousse sans pépins	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima* (Burm.) Merr.	SRA710	SRA de San Giuliano
Pamplemousse Pink	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima* (Burm.) Merr.	SRA322	SRA de San Giuliano
Pamplemousse Chandler	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima* (Burm.) Merr.	SRA608	SRA de San Giuliano
Pamplemousse Kao Pan	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima* (Burm.) Merr.	SRA321	SRA de San Giuliano
Pamplemousse Reinking	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima* (Burm.) Merr.	SRA323	SRA de San Giuliano
Pamplemousse de Tahiti	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima* (Burm.) Merr.	SRA727	SRA de San Giuliano
Pamplemousse Deep Red	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima* (Burm.) Merr.	SRA757	SRA de San Giuliano
Cédrat de Corse	*C. medica* L.	*C. medica* L.	SRA613	SRA de San Giuliano
Cédrat Etrog	*C. medica* L.	*C. medica* L.	SRA709	SRA de San Giuliano
Cédrat Main de Bouddha	*C. medica* L.	*C. medica* L.	SRA640	SRA de San Giuliano
Papeda Micrantha	*C. micrantha* Wester	*C. micrantha* Wester	-	Pépinière Bachès (Eus)
Pomelo Duncan	*C. paradisi* Marcf.	*C. paradisi* Marcf.	SRA470	SRA de San Giuliano
Pomelo Marsh	*C. paradisi* Marcf.	*C. paradisi* Marcf.	SRA284	SRA de San Giuliano
Pomelo Star Ruby	*C. paradisi* Marcf.	*C. paradisi* Marcf.	SRA293	SRA de San Giuliano
Pomelo Ruby	*C. paradisi* Marcf.	*C. paradisi* Marcf.	2005.3.095	Jardin Botanique du Montet
Mandarine douce Willowleaf	*C. reticulata* Blanco	*C. deliciosa* Ten.	SRA133	SRA de San Giuliano
Mandarine douce Fuzhu	*C. reticulata* Blanco	*C. erythrosa* Hort. ex Tan.	SRA599	SRA de San Giuliano
Mandarine douce San Hu Hong Chu	*C. reticulata* Blanco	*C. erythrosa* Hort. ex Tan.	SRA769	SRA de San Giuliano
Mandarine douce Nan Feng Mi Ju	*C. reticulata* Blanco	*C. kinokuni* Hort. ex Tan.	SRA839	SRA de San Giuliano
Mandarine Bendiguangju	*C. reticulata* Blanco	*C. nobilis* Lour.	SRA578	SRA de San Giuliano
Mandarine douce Beauty	*C. reticulata* Blanco	*C. reticulata* Blanco	SRA261	SRA de San Giuliano
Mandarine acide Sunki	*C. reticulata* Blanco	*C. sunki* (Hayata) Hort. ex Tan.	SRA705	SRA de San Giuliano
Mandarine douce Dancy	*C. reticulata* Blanco	*C. tangerina* Hort. ex Tan.	SRA552	SRA de San Giuliano
Mandarine douce Satsuma Wase	*C. reticulata* Blanco	*C. unshiu* Marc.	SRA230	SRA de San Giuliano
Mandarine douce Satsuma Owari	*C. reticulata* Blanco	*C. unshiu* Marc.	SRA221	SRA de San Giuliano
Mandarine Nasnaran	*C. reticulata* Blanco hybrid	*C. amblycarpa* (Hassk.) Ochse.	SRA896	SRA de San Giuliano
Mandarine acide Shekwasha	*C. reticulata* Blanco hybrid	*C. depressa* Hayata	SRA982	SRA de San Giuliano
Mandarine acide Cleopatra	*C. reticulata* var austera	*C. reshni* Hort. ex Tan.	SRA948	SRA de San Giuliano
Clémentine commune	*C. reticulata* × *C. sinensis*	*C. clementina* Hort.ex Tan.	SRA92	SRA de San Giuliano
Mandarine Tangor Murcott	*C. reticulata* × *C. sinensis*	*C. reticulata* × *C. sinensis*	SRA601	SRA de San Giuliano
Mandarine Fortune	(*C. reticulata* × *C sinensis*) × *C. tangerina*	*C. clementina* × *C. tangerina*	SRA31	SRA de San Giuliano
Orange douce Washington Navel	*C. sinensis* (L.) Osbeck	*C. sinensis* (L.) Osbeck	SRA217	SRA de San Giuliano
Orange douce Shamouti	*C. sinensis* (L.) Osbeck	*C. sinensis* (L.) Osbeck	SRA299	SRA de San Giuliano
Orange douce Hamlin	*C. sinensis* (L.) Osbeck	*C. sinensis* (L.) Osbeck	SRA41	SRA de San Giuliano
Orange douce Pineapple	*C. sinensis* (L.) Osbeck	*C. sinensis* (L.) Osbeck	SRA42	SRA de San Giuliano
Orange douce - Cultivar inconnu	*C. sinensis* (L.) Osbeck	*C. sinensis* (L.) Osbeck	2005.3.072	Jardin Botanique du Montet
Tangelo Minneola	*C. reticulata* Blanco x *C. paradisi* Marcf.	*C. reticulata* Blanco x *C. paradisi* Marcf.	2005.3.096	Jardin Botanique du Montet

Tableau 2. Liste des variétés d'agrumes utilisées.

1.2.2 *E. coli* ccdB Survival™

La souche *E. coli* ccdB Survival™ provient de chez Invitrogen™. Les bactéries sont stockées au congélateur à -80 °C sous forme de stocks glycérol et sont rendues électrocompétentes par le même protocole que pour la souche *E. coli* GeneHogs® (cf. protocole en annexe 2). Les bactéries *E. coli* ccdB Survival™ présentent une résistance aux effets toxiques du gène ccdB et permettent donc l'amplification et le maintien de vecteurs contenant ce gène tel que le pYeDP60_GW®. Le génotype de cette souche est le suivant : F^- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *ara*Δ139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G *ton*A::P_{trc}-*ccd*A.

1.3 Souche de levure *Saccharomyces cerevisiæ* WAT11

La souche *Saccharomyces cerevisiæ* WAT11 a été construite par le Docteur Denis Pompon du Laboratoire d'Ingénierie des Protéines Membranaires du CNRS de Gif-sur-Yvette (France) en 1996. Elle dérive de la souche *S. cerevisiæ* W303 et une recombinaison homologue a permis le remplacement du gène endogène de la NADPH P450 réductase par celui d'*A. thaliana* appelé *AthR1* (Urban *et al.*, 1997). La séquence codant pour la NADPH P450 réductase AthR1 est placée sous le contrôle du promoteur *GAL10-CYC1*, qui est réprimé en présence de glucose et induit en présence de galactose. Par ailleurs, cette souche possède une mutation sur le gène *ADE2*, ce qui l'empêche de pousser sur un milieu dépourvu d'adénine.

1.4 Vecteurs de clonage

1.4.1 pCR®8/GW

Le kit pCR®8/GW/TOPO® TA cloning provient de chez Invitrogen™. Il est utilisé pour le clonage rapide de produit de PCR avec une efficacité supérieure à 95 %. Il est vendu linéarisé et possède deux extrémités 3'-thymidine (T) sortantes, ce qui empêche sa circularisation et permet de réaliser du « TA cloning ». La topoisomérase I du virus *Vaccinia* est fixée de façon covalente au vecteur au niveau des sites spécifiques CCCTT et permet ensuite la ligation du produit de PCR au vecteur (figure 22).

Le plasmide pCR®8/GW possède une origine de réplication pUC permettant l'obtention d'un grand nombre de copies du plasmide dans *E. coli*. La présence d'un gène de résistance à la spectinomycine permet une sélection efficace des colonies transformées. Ce vecteur est aussi doté de sites d'hybridation pour les amorces universelles M13 et T7 localisées 55 paires de bases (pb) avant le site de clonage. L'utilisation d'une approche de réaction en chaîne par polymérase (PCR) permet une vérification rapide de la présence ainsi que du sens d'insertion du gène d'intérêt dans le plasmide. Par ailleurs, ces sites d'hybridation permettent aussi le séquençage des clones obtenus. Le site de clonage du vecteur pCR®8/GW

est également flanqué de deux sites *Eco*R1 pouvant être utilisés pour vérifier la bonne insertion d'un gène, mais aussi sa taille et son profil de digestion enzymatique.

Le kit pCR®8/GW/TOPO® TA cloning bénéficie de la technologie Gateway®, ce qui permet ensuite de transférer par recombinaison le produit de PCR initial dans un vecteur de destination Gateway® (ex : vecteur d'expression pYeDP60_GW®). Cette recombinaison a lieu au niveau des sites *att*L1 et *att*L2 du vecteur pCR®8/GW.

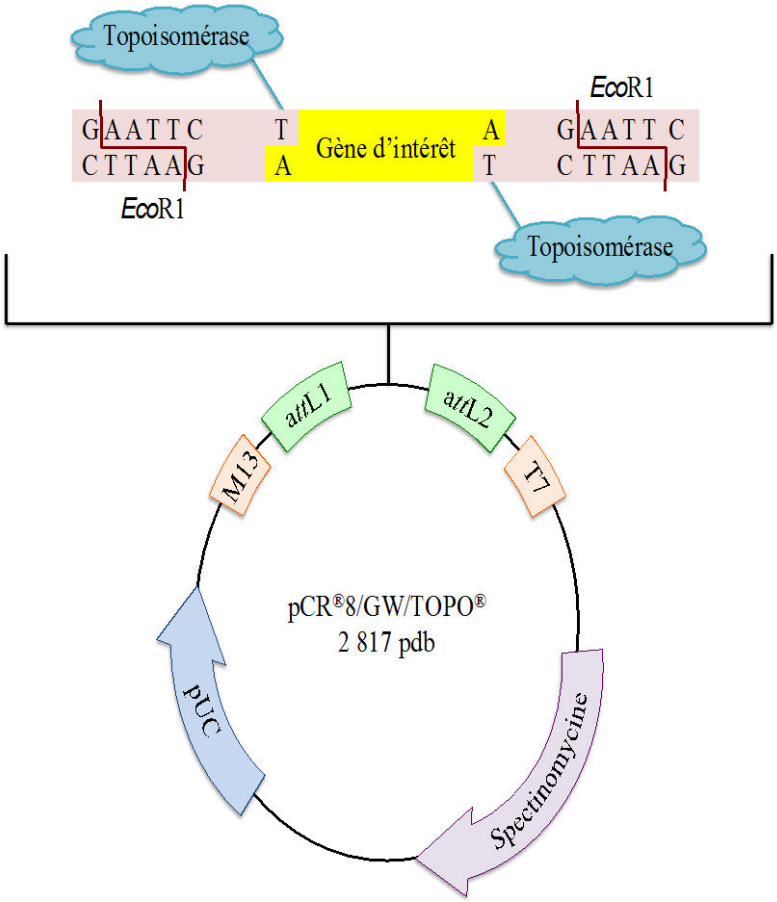


Figure 22. Représentation schématique du vecteur du kit pCR®8/GW/TOPO® TA cloning.

1.4.2 pYeDP60_GW®

Le vecteur pYeDP60_GW® dérive directement du vecteur pYeDP60 qui nous a été fourni par le Docteur Denis Pompon du Laboratoire d'Ingénierie des Protéines Membranaires du CNRS de Gif-sur-Yvette (France). Il a été construit dans le but de réaliser l'expression de cytochromes P450. L'ajout de la technologie Gateway® au vecteur pYeDP60 a été réalisé par Célia Krieger au cours de sa thèse dans notre laboratoire. Pour cela, elle a inséré la cassette de clonage RfA flanquée des sites *att*R et contenant le gène ccdB et le gène de résistance au chloramphénicol, dans le plasmide pYeDP60. Cette insertion a été effectuée au niveau du site de restriction *Bam*H1 (au niveau du site de clonage multiple ou polylinker), où a eu lieu la digestion du vecteur dont les extrémités sortantes ont été converties en extrémités franches

grâce à la T4 DNA polymérase ou fragments de Klenow (Krieger, 2014). Une fois le vecteur pYeDP60_GW® construit, sa multiplication passe par la transformation de bactéries *E. coli* ccdB Survival™ (résistantes au gène ccdB) ensuite étalées sur un milieu sélectif contenant du chloramphénicol et de l'ampicilline. L'intérêt de la technologie Gateway® est de pouvoir effectuer des sous-clonages rapides et efficaces de gènes d'intérêt dans divers vecteurs de destination. Dans le cas d'un transfert du gène cible depuis le plasmide pCR®8/GW vers le plasmide pYeDP60_GW®, la recombinaison s'effectue au niveau des sites a*tt*L1-a*tt*R1 et a*tt*L2-a*tt*R2.

Le plasmide pYeDP60_GW® possède une origine de réplication bactérienne ColE1 ainsi qu'une origine de réplication de levure 2µ permettant la réplication du plasmide dans *E. coli* et *S. cerevisiæ*. La présence d'un gène de résistance à l'ampicilline permet la sélection des colonies bactériennes transformées. En ce qui concerne les levures, le pYeDP60_GW® contient les gènes *URA3* et *ADE2* leur permettant de pallier leur auxotrophie pour l'adénine et l'uracile et de se développer sur un milieu dépourvu de ces deux bases (figure 23). Le plasmide possède également un polylinker contenant les sites de restriction *Sma*1 *Kpn*1, *Sac*1 et *Eco*R1. Il est encadré en amont par le promoteur *GAL10-CYC1* et en aval par un terminateur PGK. Le promoteur *GAL10-CYC1* est induit par le galactose et réprimé par le glucose, permettant ainsi une maîtrise de l'expression du gène d'intérêt inséré dans le pYeDP60_GW®. Par ailleurs, une fois le gène d'intérêt inséré dans le pYeDP60_GW®, il est possible de le séquencer grâce à des amorces s'hybridant en amont (extrémité Bam) et en aval (extrémité Eco) du gène (tableau 3).

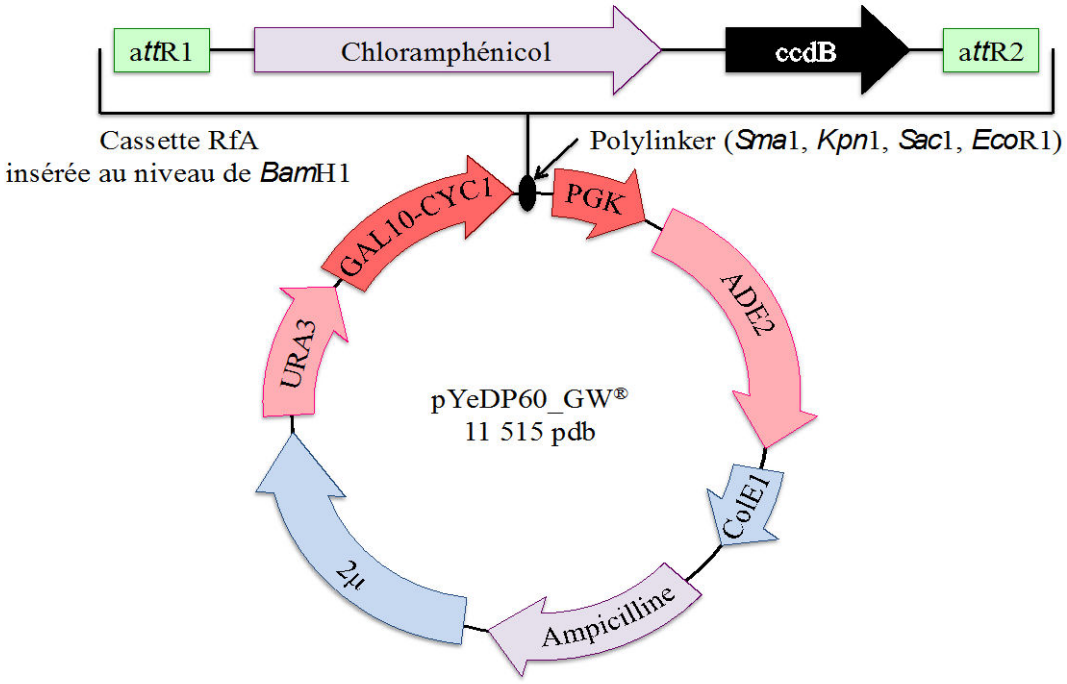


Figure 23. Représentation schématique du vecteur pYeDP60_GW®.

Amorces	Séquences
Ye Bam	5' TCTTTCCTTATACATTAGGTCC 3'
Ye Eco	5' CAACACCTGGCAATTCCTTACC 3'

Tableau 3. Amorces permettant le séquençage du pYeDP60_GW® en amont et en aval du gène sous-cloné.

1.5 Milieux de culture

1.5.1 Milieux de culture de bactéries

1.5.1.1 Préparation du milieu Luria-Bertani

Le milieu Luria-Bertani (LB) constitue le milieu de base pour le développement des bactéries que j'ai utilisées au cours de ma thèse. Ce milieu est préparé en mélangeant 25 g de poudre LB Broth Miller (fournisseur BD) à 1 L d'eau distillée et en autoclavant le tout (stérilisation à 120 °C pendant 20 min à 1,3 bar). La composition de la poudre LB est telle qu'un litre de milieu contient 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl. Pour la préparation de milieu LB solide, il faut en plus ajouter 16 g d'agar pour 1 L de milieu. Le milieu LB liquide autoclavé est ensuite stocké à température ambiante, tandis que les boîtes de Pétri contenant le milieu gélifié sont conservées au réfrigérateur à 4 °C, notamment pour éviter la dégradation des antibiotiques s'il y en a.

1.5.1.2 Préparation des antibiotiques

Les antibiotiques permettent de sélectionner des colonies de bactéries transformées par différents plasmides. Ils sont ajoutés au milieu LB après l'autoclavage et avant que le milieu n'ait solidifié (température de 50 °C environ) dans le cas de la préparation de boîtes de Pétri. Les solutions stocks d'antibiotiques sont préparées en diluant les poudres dans différents solvants (tableau 4).

Antibiotique	Plasmide porteur du gène de résistance	Solvant	Concentration de stockage (mg/mL)	Concentration d'utilisation (mg/L)
Spectinomycine	pCR®8/GW	Eau	100	100
Chloramphénicol	pYeDP60_GW® vide	Éthanol	100	100
Ampicilline	pYeDP60_GW®-gène d'intérêt	Eau	100	100

Tableau 4 : Liste des antibiotiques utilisés.

Nom de l'antibiotique, choix de son utilisation (en fonction des plasmides porteurs des gènes de résistance à ces antibiotiques), solvant pour la dilution et concentrations de stockage et d'utilisation. Pour information, la spectinomycine et l'ampicilline proviennent de chez Duchefa Biochemie et le chloramphénicol provient de chez Sigma-Aldrich®.

1.5.2 Milieux de culture de levures

1.5.2.1 Milieu YPGA

Le milieu YPGA est un milieu de culture complet contenant de l'adénine, ce qui permet la croissance des souches de levures *S. cerevisiæ* WAT11 sauvages présentant une mutation du gène *ADE2*. Ce milieu est utilisé aussi bien sous forme liquide que solide, où il est coulé dans des boîtes de Pétri après l'ajout d'agar à 16 g/L avant l'autoclavage. Le tableau 5 indique la composition de ce milieu.

1.5.2.2 Milieu SGI

Le milieu SGI est un milieu sélectif ne contenant pas d'adénine et permettant la sélection de levures transformées par les plasmides pYeDP60 ou pYeDP60_GW® recombinant ou non. En effet, ces plasmides contiennent le gène *ADE2* natif permettant à la levure de devenir prototrophe pour l'adénine et donc de pousser sur un milieu SGI. Ce dernier est utilisé sous forme liquide ou solide, coulé dans des boîtes de Pétri après l'ajout d'agar à 16 g/L avant l'autoclavage. La composition du milieu SGI est indiquée dans le tableau 5.

1.5.2.3 Milieu YPGE

Le milieu YPGE est un milieu de culture complet permettant la croissance des levures transformées par les plasmides pYeDP60 ou pYeDP60_GW® recombinant ou non. La présence de glucose inhibe les promoteurs *GAL10-CYC1* et donc la production dans la levure de la NADPH P450 réductase AthR1 et de la protéine d'intérêt dont la séquence codante est clonée dans le pYeDP60_GW®. En l'absence d'une pression de sélection, les levures utilisent le glucose comme première source carbonée. Lorsqu'il n'est plus disponible, elles utilisent alors l'éthanol. La disparition totale de glucose permettra par la suite d'induire en présence de galactose les promoteurs *GAL10-CYC1* et donc la production des protéines citées plus haut dans ce paragraphe. J'ai utilisé le milieu YPGE sous forme liquide uniquement et sa composition est décrite dans le tableau 5.

1.5.2.4 Milieu YPL

Le milieu YPL est un milieu de culture contenant du galactose qui induit les promoteurs *GAL10-CYC1* et donc la production de la NADPH P450 réductase AthR1 et de la protéine d'intérêt dans la levure. J'ai utilisé ce milieu sous forme liquide uniquement. Le tableau 5 indique sa composition.

	YPGA	SGI	YPGE	YPL
Extrait de levure (g)	10	-	10	10
Bactopeptone (g)	10	-	20	20
Bactocasaminoacides (g)	-	1	-	-
Yeast nitrogen base (g)	-	7	-	-
Tryptophane (mg)	-	20	-	-
Adénine (solution à 20 mg/mL)	10 mL	-	-	-
Glucose (g)	20	20	5	-
Galactose (g)	-	-	-	20
Éthanol après autoclavage (%, v/v)	-	-	3	-

Tableau 5. Composition des milieux de culture des levures pour 1 L.

Pour information, l'extrait de levures, le bactopeptone et les bactocasaminoacides proviennent de chez BD ; le yeast nitrogen base et le galactose de chez Carl Roth® ; le tryptophane de chez Alfa Aesar® ; l'adénine et l'éthanol de chez Sigma-Aldrich® et le glucose de chez Fisher Scientific.

2. Méthodes utilisées

2.1 Méthodes de biologie moléculaire

2.1.1 Extractions de l'ADN génomique de plantes

J'ai effectué les extractions d'ADN génomique (ADNg) d'agrumes en utilisant le mini kit DNeasy® pour plantes de Qiagen et en suivant le protocole fourni. J'ai réalisé ces extractions à partir de 80 à 100 mg de feuilles fraîches que j'ai broyées dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon en céramique préalablement refroidis. L'élution finale des ADNg s'effectue avec un volume de deux fois 100 µL de tampon AE. J'ai mesuré leurs concentrations à l'aide du spectrophotomètre BioPhotometer d'Eppendorf avant de les stocker au congélateur à -20 °C.

2.1.2 Extraction des ARN totaux d'agrumes

Pour extraire les ARN totaux présents dans les agrumes, j'ai utilisé le mini kit RNeasy® de Qiagen et le kit E.Z.N.A.® d'Omega Bio-Tek, tous deux spécialement conçus pour les extraction d'ARN de plantes. Les extractions d'ARN étant délicates du fait de la présence de RNases dans l'environnement, il est nécessaire de nettoyer la paillasse, les mortiers, les pilons et les spatules avec du RNase*Zap* (Ambion®) sous forme de solution ou de lingettes, afin d'éliminer les RNases. Avant chaque extraction, j'ai broyé le matériel végétal frais (peau, flavédo, albédo, pulpe ou feuille d'agrumes) dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon en céramique préalablement refroidis.

Les protocoles fournis dans les kits d'extraction d'ARN sont assez bien adaptés à des tissus tels que les feuilles ou la peau (flavédo + albédo) d'agrumes. En revanche, pour la pulpe d'agrumes qui est très acide et qui, lorsque le fruit est mûr, ne contient quasiment que de l'eau et très peu de cellules végétales, il est nécessaire d'adapter les protocoles. Les

changements que j'ai effectués concernent principalement la quantité de matériel végétal initial, l'étape de lyse des cellules végétales et la neutralisation de l'extrait avant la fixation des ARN sur la membrane de la colonne d'extraction. Le tableau 6 résume les conditions expérimentales choisies telles que proposées dans les protocoles fournis ou ajoutées ou modifiées (en gras) dans le cadre de l'optimisation de l'extraction d'ARN.

	Kit RNeasy®		Kit E.Z.N.A.®	
Tissus d'agrumes	Peau	Feuille	Peau (flavédo et/ou albédo)	Pulpe
Poids frais nécessaire	80 à 100 mg	80 à 100 mg	80 à 100 mg	**≈ 400 mg**
Volume et tampon de lyse choisi	450 µL RLT	450 µL RLT	500 µL de RB	**1 mL** de RB
Lyse des cellules végétales (ThermoMixer® Eppendorf)	Agitation 3 min à **600 rpm** et 56°C	Agitation 3 min à **600 rpm** et 56°C	**Agitation 3 min à 1400 rpm et 56°C**	**Agitation 3 min à 1400 rpm et 56°C**
Ajustement du pH	Non	Non	Non	**Oui**
Digestion d'ADNg sur colonne	Oui	Oui	Non	Non
Digestion d'ADNg en solution	Oui	Oui	Oui	Oui
Chauffage du tampon d'élution à 65°C	Non	Non	Oui	Oui
Deuxième élution avec le volume de la première élution	Non	Non	Oui	Oui

Tableau 6. Conditions expérimentales choisies ou adaptées (en gras) pour une extraction optimale d'ARN totaux de divers tissus d'agrumes.

L'ajustement du pH évoqué dans le tableau 6 permet d'augmenter les rendements lors des extractions d'ARN de pulpe d'agrumes. Pour une extraction optimale, le pH doit être compris entre 6,5 et 7,5, du fait de la nature de la membrane des colonnes d'extraction. Pour cela, j'ai préparé une solution de NaOH à 1 M avec de l'eau ultrapure traitée au pyrocarbonate d'éthyle ou DEPC (1 mL de DEPC pur dans 1 L d'eau ultrapure incubée pendant 24 h à 37 °C puis autoclavée), afin d'éliminer toutes les ribonucléases. Il est à noter qu'en fonction des variétés d'agrumes et de leur stade de maturité, le volume de NaOH à ajouter pour neutraliser le milieu n'est pas le même (tableau 7). J'ai vérifié le pH à l'aide de bandelettes de papier pH (Dutscher).

Fruit	Stade de maturité	Volume de NaOH (µL)
Pomelo	Jeune fruit	90
	Stade intermédiaire	180
	Fruit mûr	300
Citron	Jeune fruit	90
	Stade intermédiaire	500
	Fruit mûr	650
Mandarine	Fruit mûr	250
Tangelo	Fruit mûr	300

Tableau 7. Volume de NaOH nécessaire à l'ajustement du pH pour une extraction optimale d'ARN totaux de pulpe d'agrumes.

Le milieu de lyse contient environ 400 mg de pulpe d'agrume et 1 mL de tampon RB.

Les protocoles des deux kits proposent d'effectuer une digestion de l'ADNg présent dans les échantillons sur la colonne d'extraction d'ARN et/ou en solution. Lors des

extractions d'ARN avec le kit RNeasy®, j'ai effectué la digestion de l'ADNg sur colonne et en solution à l'aide du kit RNase-Free DNase Set de Qiagen, en suivant le protocole fourni. Pour les extractions d'ARN réalisées avec le kit E.Z.N.A.® d'Omega Bio-Tek, j'ai procédé à la digestion de l'ADNg en solution après l'extraction d'ARN. Pour cela, j'ai utilisé le kit Amplification Grade DNase I de Sigma-Aldrich®, en suivant le protocole fourni.

À la fin des extractions d'ARN, j'ai mesuré leurs concentrations avec le BioPhotometer d'Eppendorf et j'ai vérifié leur intégrité sur gel d'agarose à 1 % avant de les stocker au congélateur à -80 °C. Les caractéristiques d'un échantillon d'ARN totaux de plante correctement préparé après dépôt et migration sur gel sont : la présence de deux bandes intenses autour de 1500 pb correspondant aux ARN ribosomiques, la présence d'un smear correspondant à des ARN de tailles diverses, l'absence de bandes correspondant à des fragments de petite (environ 100 pb) et de grande taille (environ 10 000 pb) qui sinon indiqueraient respectivement la dégradation des ARN extraits et la présence d'ADNg dans la préparation.

2.1.3 Synthèse d'ADNc par transcription inverse

Une fois les ARN totaux extraits, j'ai effectué la synthèse de leurs ADNc avec le kit de transcription inverse « High Capacity RNA-to-cDNA » d'Applied Biosystems®, en suivant le protocole fourni. La quantité maximale d'ARN utilisée pour la réaction est de 2 µg pour un volume final de 20 µL (soit une concentration de 0,1 µg/µL). La conservation des ADNc s'effectue au congélateur à -20 °C.

2.1.4 Amplification de fragments d'ADN par PCR

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) permet d'amplifier des fragments d'ADN *in vitro*. Elle se compose de plusieurs étapes qui sont les suivantes :

1. Une première étape de chauffage à 95 °C ou 98 °C selon les kits utilisés permet la dénaturation de l'ADN, l'homogénéisation du milieu par agitation thermique, l'activation de l'enzyme dans certains cas, mais aussi la lyse de cellules dans le cas d'une PCR réalisée sur une suspension bactérienne. Cette étape dure 1 à 10 min s'il est nécessaire de lyser des bactéries.
2. Après la dénaturation initiale, une nouvelle dénaturation des brins d'ADN est effectuée à 95 °C ou 98 °C pendant 10 à 30 sec selon les kits. Il s'agit de la première phase du cycle de PCR.
3. La deuxième phase du cycle de PCR est une étape d'hybridation des amorces sur la matrice d'ADN. La température d'hybridation utilisée se calcule grâce aux températures de fusion (Tm) des amorces sens et antisens. La Tm correspond à la température optimale pour une hybridation spécifique des amorces sur le brin d'ADNc. À cette température, la moitié de l'ADN est sous forme simple brin et l'autre

moitié sous forme double brin. La Tm dépend de la longueur de l'amorce, de sa teneur en bases puriques et se calcule suivant ces équations :

$$Tm = 2\,(A + T) + 4\,(G + C)$$

→ si l'amorce fait moins de 20 pb (équation de Wallace-Itakura)

$$Tm = 69{,}3 + 0{,}41\,(\%\,GC) - \frac{650}{N}$$

→ où N est le nombre de paires de bases et est supérieur à 20

La température d'hybridation correspond à Tm – 5 °C. Cette phase du cycle de PCR dure entre 10 et 30 sec suivant les kits.

4. La dernière phase du cycle de PCR correspond à la synthèse du brin complémentaire d'ADN par l'ADN polymérase. Cette élongation s'effectue à 68 °C ou 72 °C et sa durée dépend de la longueur du fragment amplifié (30 sec à 1 min par kpb suivant les kits).

Les étapes 2 à 4 sont renouvelées pendant 25 à 40 cycles. Une élongation finale est réalisée à 68 °C ou 72 °C pendant 10 min après les différents cycles de PCR. Pour finir, les produits de PCR sont conservés à une température de 12 °C dans le thermocycleur. Pour toutes les amplifications de fragments d'ADN par PCR, j'ai utilisé les thermocycleurs C1000 Touch™ de BioRad et PTC-200 de MJ Research.

2.1.4.1 Amplification classique

J'ai effectué les amplifications classiques (non haute fidélité) par PCR en utilisant les *Taq* ADN polymérases des kits PCR Master Mix (2×) de Fermentas et EmeraldAmp® PCR Master Mix de Takara, en suivant les protocoles fournis. Le Master Mix de Fermentas contient le tampon de réaction, les dNTPs (à une concentration de 0,4 mM chacun), le $MgCl_2$ (à une concentration de 4 mM) et la *Taq* polymérase (à une concentration de 0,05 U/µL). La composition du Master Mix de Takara n'est pas précisée. Dans tous les cas, pour un mix réactionnel de 10 µL, il est juste nécessaire d'ajouter au mélange l'ADN matriciel (entre 1 et 2 µL), les amorces (à une concentration de 0,5 à 1 µM) et l'eau ultrapure. Les programmes de PCR utilisés sont décrits dans le tableau 8.

	PCR Master Mix (2×) - Fermentas			EmeraldAmp® PCR Master Mix - Takara		
	Température	Durée	Nombre de cycles	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	1 à 10 min	1	98°C	5 à 10 min	1
Dénaturation	95°C	30 sec		98°C	10 sec	
Hybridation	Tm	30 sec	25 à 40	Tm	30 sec	30
Élongation	72°C	1 min/kpb		72°C	1 min/kpb	
Élongation finale	72°C	10 min	1	72°C	10 min	1

Tableau 8. Programmes de PCR utilisés pour les amplifications classiques.

J'ai utilisé ces kits dans le cadre d'amplifications d'ADN ne nécessitant pas une haute fidélité, comme par exemple la vérification de l'efficacité d'amorces ou la vérification de l'insertion de séquences d'ADN codantes dans différents vecteurs (PCR sur colonies).

2.1.4.2 Amplification haute fidélité

La caractérisation fonctionnelle de gènes nécessite tout d'abord une amplification fidèle de la séquence codante cible. Pour cela, j'ai utilisé les kits KAPA3G Plant PCR de Kapa Biosystems et PrimeSTAR® Max de Takara, en suivant les protocoles fournis. Le kit KAPA3G contient un mélange d'ADN polymérases de la famille A (type *Taq* polymérase) et de la famille B (polymérase d'archée) et d'anticorps qui inactivent les enzymes jusqu'à la première étape de dénaturation. L'ADN polymérase de type B est capable de corriger les erreurs du fait de son activité 3'-5' exonucléasique. Cette enzyme est ainsi quatre à dix fois plus fidèle qu'une *Taq* ADN polymérase ne présentant pas d'activité correctrice. Concernant la polymérase de type A, elle ne possède pas d'activité exonucléasique. En revanche, elle permet d'obtenir un produit de PCR dont les extrémités 3' sont pourvues de désoxyadénosines, ce qui permet ensuite sa ligation dans le pCR®8/GW par complémentarité T-A. Par ailleurs, ce mélange d'enzymes possède une meilleure tolérance aux inhibiteurs de PCR contenus dans les plantes comme les polyphénols et les polysaccharides. Le kit comprend aussi le tampon KAPA Plant PCR (2×) contenant du $MgCl_2$ à une concentration de 1,5 mM et les dNTPs à une concentration de 0,2 mM chacun. Le mélange réactionnel de 50 µL contient : 25 µL de tampon (2×), 1,5 µL de chacune des amorces sens et antisens à une concentration de 10 µM (concentration finale de 0,3 µM), 1 à 2 µL d'ADNc, 0,4 µL du mélange d'enzyme KAPA3G à une concentration de 2,5 U/µL et de l'eau ultrapure pour compléter à 50 µL.

Le kit PrimeSTAR® Max contient lui aussi une polymérase avec une activité 3'-5' exonucléasique, permettant ainsi une amplification haute fidélité de la séquence codante cible. En revanche, la plupart des produits de PCR obtenus possèdent des bouts francs du fait de l'activité correctrice de l'enzyme. Il n'est donc pas possible de réaliser un « TA cloning » directement après une amplification avec la PrimeSTAR® Max. Avant cela, il faut réaliser une incubation du produit de PCR avec une *Taq* ADN polymérase sans activité correctrice, de manière à obtenir un produit de PCR dont les extrémités 3' sont pourvues de désoxyadénosines. Cet ajout se fait en mélangeant 3 µL de produit de PCR avec 3 µL de Master Mix (2×) de Fermentas et en incubant le tout à 68 °C pendant une demi heure. Le kit PrimeSTAR® Max ne comporte qu'un tube prêt à l'emploi contenant entre autres la polymérase et du Mg^{2+} à une concentration de 2 mM. La réaction de PCR s'effectue dans un volume de 50 µL contenant : 25 µL de PrimeSTAR® Max Premix (2×), 1,5 µL de chacune des amorces sens et antisens à une concentration de 10 µM (concentration finale de 0,3 µM), 1 à 2 µL d'ADNc et de l'eau ultrapure pour compléter à 50 µL.

Si l'amplification fidèle de la séquence codante d'un gène est une étape indispensable pour sa caractérisation fonctionnelle, il faut aussi pouvoir s'assurer que la protéine qu'il code a bien été produite dans le système d'expression hétérologue choisi. Pour cela, nous avons décidé de modifier les séquences codantes cibles au niveau de l'extrémité 3', en créant des

amorces antisens possédant 18 nucléotides codant pour six histidines juste avant le codon stop. La présence d'une queue poly histidines artificielle sur la protéine permettra par la suite sa révélation par Western Blot. L'ajout de ces 18 nucléotides sur l'amorce antisens impose une modification du programme de PCR classique (tableau 9). En effet, les premiers cycles doivent s'effectuer à une température assez basse (Tm_1) permettant l'hybridation des amorces, malgré les 18 bases qui ne s'hybrideront pas. Ainsi, au bout de cinq cycles, il est possible de remonter la température d'hybridation (Tm_2) afin d'obtenir une amplification plus spécifique et ayant intégré l'ajout des 18 bases dans la séquence d'ADN cible.

	KAPA3G Plant PCR - Kapa Byosystems			PrimeSTAR® Max - Takara		
	Température	Durée	Nombre de cycles	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95°C	5 min	1	98°C	5 min	1
Dénaturation	95°C	20 sec		98°C	10 sec	
Hybridation	Tm_1	15 sec	5	Tm_1	15 sec	5
Élongation	72°C	30 sec/kpb		72°C	5 sec/kpb	
Dénaturation	95°C	20 sec		98°C	10 sec	
Hybridation	Tm_2	15 sec	35	Tm_2	15 sec	30
Élongation	72°C	30 sec/kpb		72°C	5 sec/kpb	
Élongation finale	72°C	10 min	1	72°C	10 min	1

Tableau 9. Programmes de PCR utilisés pour les amplifications haute fidélité.

2.1.5 Électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

L'électrophorèse permet la séparation dans un tampon de fragments d'ADN ou d'ARN chargés négativement en fonction de leur poids moléculaire. Cette séparation s'effectue sur un gel d'agarose, plus ou moins concentré en fonction de la taille des fragments attendue. Ces gels d'agarose sont préparés dans du tampon TAE (Tris-Acétate à une concentration de 40 mM ; EDTA à une concentration de 1 mM). La migration s'effectue dans une cuve contenant le gel baignant dans ce même tampon TAE. Avant le dépôt sur le gel, les échantillons sont additionnés d'un tampon de charge commercial (6× DNA Loading Dye #R0611 ou 6× MassRuler DNA Loading Dye #R0621 de Thermo Scientific) à diluer six fois. Par ailleurs, le premier puits contient systématiquement un marqueur de poids moléculaire commercial afin d'identifier la taille approximative de longs fragments d'ADN (80 à 10 000 pb avec le MassRuler™ DNA Ladder Mix ready-to-use #SM0403 de Thermo Scientific) ou de petits fragments d'ADN (50 à 1000 pb avec le GeneRuler 50 bp DNA Ladder ready-to-use #SM0373 de Thermo Scientific) présents dans les échantillons. Lors de la migration, le gel est généralement soumis à une tension de 110 V pendant 40 min.

Pour la révélation des gels, j'ai utilisé le bromure d'éthidium (BET) qui est un composé ayant la capacité de s'intercaler entre les acides nucléiques et de devenir fluorescent sous un rayonnement ultraviolet. À la fin d'une migration, je plongeais le gel dans un bain de BET à 0,04 % (v/v) pendant 15 min puis je l'analysais sous un rayonnement ultraviolet (λ = 254 nm).

2.1.6 Extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose

Lors de la révélation d'un gel d'agarose sous UV, j'ai découpé les bandes de gel contenant l'ADN d'intérêt à l'aide d'un scalpel. Je les ai ensuite transférées dans un microtube de 2 mL et pesées. Pour effectuer les extractions d'ADN à partir du gel d'agarose, j'ai utilisé le kit « MinElute Gel Extraction » de Qiagen, en suivant le protocole fourni. À la fin du protocole, j'ai élué les ADNc avec 10 µL de tampon EB avant de les placer au congélateur à -20 °C.

2.1.7 Ligation d'un ADNc dans le vecteur pCR®8/GW

J'ai réalisé les ligations de séquences d'ADNc dans le vecteur pCR®8/GW en utilisant le kit « pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® » d'Invitrogen™. Le mélange réactionnel de 3 µL contient : 2 µL de produit de PCR purifié, 0,5 µL de solution saline diluée au quart (concentrations initiales : 1,2 M de NaCl et 0,06 M de $MgCl_2$) et 0,5 µL de vecteur pCR®8/GW (concentration initiale de 5 à 10 ng/µL). Pour être sûre d'avoir une bonne efficacité de ligation, je laissais incuber le tout à température ambiante pendant 24 h.

2.1.8 Transformation génétique de bactéries électrocompétentes

Les souches de bactéries électrocompétentes telles que *E. coli* GeneHogs® et ccdB Survival™ peuvent être transformées génétiquement par électroporation. Cette méthode vise à appliquer un choc électrique rapide et de haut voltage sur les bactéries afin de rendre leurs membranes temporairement perméables. De cette manière, le plasmide peut pénétrer dans la bactérie. Pour cela, il faut ajouter à un aliquot de 45 µL de bactéries électrocompétentes 1 µL de produit de ligation ou de produit de recombinaison ou de plasmide purifié et transférer délicatement le tout dans une cuve d'électroporation préalablement refroidie sur la glace. Le choc électrique s'effectue dans l'électroporateur BioradMicropulseur™ sur le programme « EC2 » (cuves dont les électrodes sont séparées de 2 mm). Le voltage appliqué est de 2,5 kV, la résistance de 200 Ω et la capacité électrique de 25 µF. Une fois le choc effectué, il est nécessaire de resuspendre immédiatement les bactéries dans 300 µL de milieu LB liquide préalablement refroidi sur la glace. La suspension bactérienne doit ensuite être mise à incuber pendant une heure à 37 °C au bain Marie. Cette étape de régénération permet aux bactéries transformées d'acquérir la résistance à l'antibiotique apportée par le plasmide. Finalement, il faut étaler la suspension bactérienne sur une boîte de Pétri contenant du milieu LB gélifié et l'antibiotique de sélection et incuber le tout une nuit à l'étuve à 37 °C.

2.1.9 Sélection de colonies bactériennes correctement transformées

Au lendemain d'une transformation de bactéries électrocompétentes, j'ai réalisé des PCR sur colonies afin de sélectionner celles qui avaient été correctement transformées. En

effet, la ligation d'une séquence d'ADNc dans le pCR®8/GW n'est pas directionnelle. Pour cela, j'ai piqué différentes colonies à l'aide de petits cônes de pipettes et j'ai resuspendu les bactéries dans 10 µL d'eau ultrapure. Sur ces 10 µL, j'en ai utilisé 2 pour réaliser une PCR utilisant l'amorce universelle M13 présente dans le vecteur pCR®8/GW et l'amorce antisens du gène à l'extrémité 3' (protocole décrit dans le paragraphe 2.1.4.1). Ainsi, l'amplification d'une séquence d'ADN de la bonne taille indique que le fragment d'intérêt a été inséré dans le bon sens dans le vecteur (figure 24). Dans ce cas, j'ai utilisé les 8 µL restants pour inoculer 2 mL de milieu LB liquide contenant 2 µL de spectinomycine à 100 mg/mL et j'ai incubé le tout à 37 °C pendant une nuit sous agitation à 160 rpm.

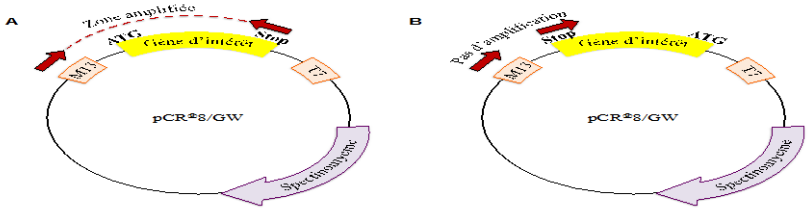


Figure 24. Schéma représentant l'insertion d'un gène d'intérêt dans le vecteur pCR®8/GW.

(A) L'insertion du gène d'intérêt dans le bon sens dans le vecteur permet son amplification par PCR. (B) Dans le cas d'une insertion du gène d'intérêt dans le mauvais sens, il n'est pas possible d'obtenir une amplification par PCR.

2.1.10 Purification de plasmides

Après avoir mis en culture pendant une nuit les colonies bactériennes présentant un gène d'intérêt de la bonne taille et dans le bon sens dans le pCR®8/GW, je les ai centrifugées à environ 2000 × *g* pendant 5 min. Le surnageant est éliminé tandis que le culot bactérien est conservé pour l'extraction plasmidique. Pour la réaliser, j'ai utilisé le kit GeneJET Plasmid Miniprep de Thermo Scientific, en suivant le protocole fourni. Le principe est de resuspendre les bactéries, de les lyser en milieu alcalin et de récupérer les plasmides sur une colonne d'affinité. Le volume d'élution final est de 50 µL. Une fois purifiés, j'ai conservé les plasmides au congélateur à -20 °C. Par ailleurs, je vérifiais la séquence du gène d'intérêt cloné dans le plasmide en envoyant un échantillon au séquençage (Macrogen, Pays-Bas).

2.1.11 Digestion de plasmides par des enzymes de restriction

Pour vérifier le profil de digestion des gènes d'intérêt insérés dans les différents vecteurs, j'ai réalisé des digestions avec les enzymes de restriction « Fast Digest » de Thermo Scientific. Elles permettent une digestion rapide et complète de l'ADN avec lequel elles sont incubées. La réaction de digestion s'effectue dans un volume de 10 µL (complété avec de l'eau ultrapure) contenant 1 µL de tampon ×10, 1 µL d'enzyme de restriction (généralement *Eco*RI) et jusqu'à 1 µg de plasmide (généralement 5 µL). Le tout doit incuber à 37 °C pendant 20 min.

2.1.12 Transfert d'un gène d'intérêt du pCR®8/GW vers le pYeDP60_GW® par LR-recombinaison

Si les résultats de séquençage d'un gène d'intérêt inséré dans le pCR®8/GW étaient bons, j'effectuais leur transfert dans le vecteur pYeDP60_GW® par LR-recombinaison. Pour cela, j'ai utilisé le mix d'enzyme Gateway® LR Clonase™ II d'Invitrogen™, en suivant le protocole fourni. La technologie Gateway® présente dans les vecteurs pCR®8/GW et pYeDP60_GW® permet la recombinaison de la séquence *att*L1 – gène d'intérêt – *att*L2 du clone d'entrée (pCR®8/GW - gène d'intérêt) et de la séquence *att*R1 – gène *ccdB* – *att*R2 du vecteur de destination (pYeDP60_GW®) (figure 25).

Le mélange réactionnel de 10 µL contient : 3 µL de clone d'entrée (50 à 150 ng), 2 µL de vecteur de destination à une concentration de 150 ng/µL, 3 µL de tampon TE à pH 8,0 (Tris à une concentration de 10 mM ajusté à pH 8,0 à l'acide chlorhydrique, EDTA à une concentration de 1 mM) et 2 µL de LR Clonase™ II. J'ai incubé le tout 4 h à 25 °C pour être sûre d'avoir une bonne efficacité de LR-recombinaison. Pour achever la réaction j'ai ajouté 1 µL de protéinase K et j'ai mis à incuber 10 min à 37 °C.

Par la suite, j'ai effectué des transformations de bactéries électrocompétentes *E. coli* GeneHogs® avec 1 µL de produit de LR-recombinaison de la façon décrite dans le paragraphe 2.1.8. Le lendemain, j'ai repiqué quatre colonies dans 2 µL de milieu LB liquide supplémenté de 2 µL d'ampicilline à 100 mg/mL et j'ai incubé le tout à 37 °C pendant une nuit sous agitation à 160 rpm. Il est à noter que le gène d'intérêt est inséré dans le vecteur de destination dans le même sens que dans le vecteur d'entrée grâce à la recombinaison *att*L1 – *att*R1 et *att*L2 – *att*R2. Il n'est donc pas nécessaire d'effectuer des PCR sur colonies pour vérifier le sens d'insertion du gène dans le plasmide pYeDP60_GW®. Le surlendemain, j'ai effectué la purification des plasmides répliqués dans les bactéries telle que décrite dans le paragraphe 2.1.10. Par la suite, une digestion enzymatique (cf. paragraphe 2.1.11) permet de vérifier le profil de digestion des gènes d'intérêt et l'envoi au séquençage des plasmides permet de s'assurer de la bonne séquence du gène.

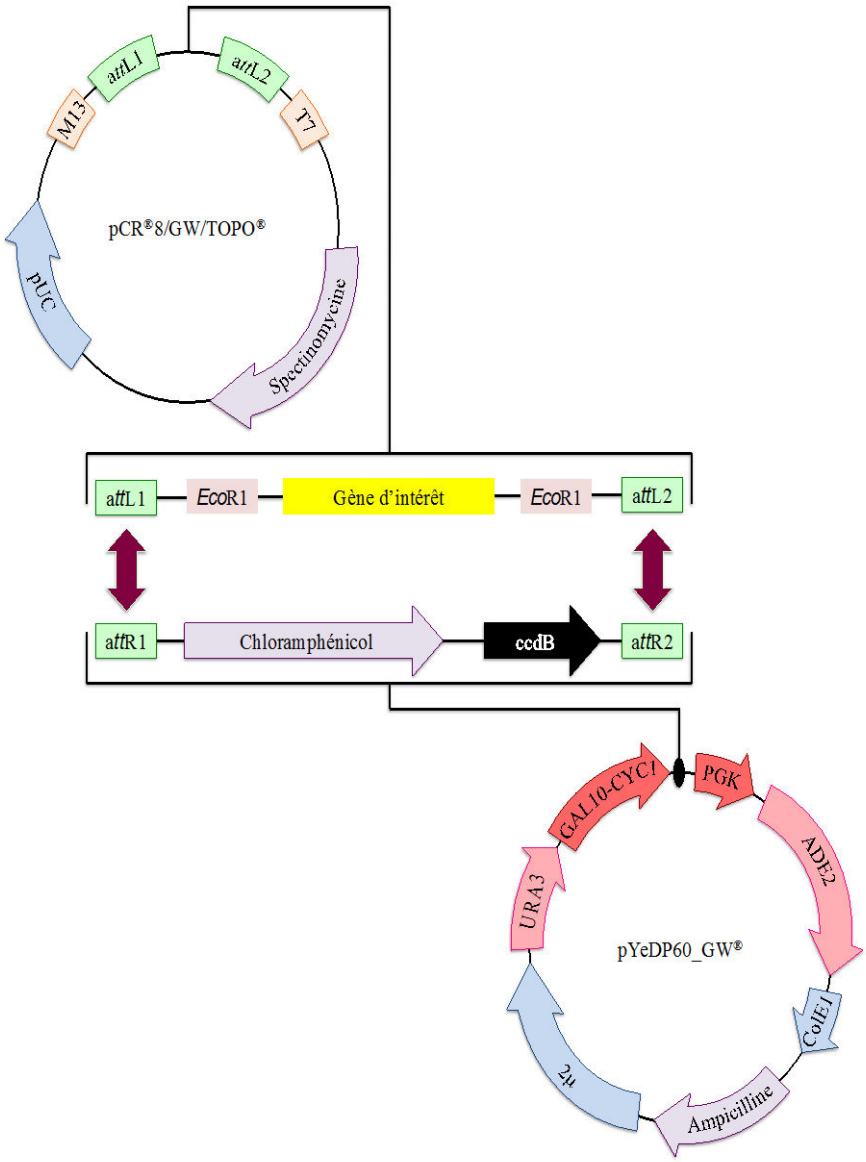


Figure 25. Représentation schématique de la LR-recombinaison d'un gène d'intérêt depuis le pCR®8/GW vers le pYeDP60_GW®.

2.1.13 Quantification relative du niveau d'expression d'un gène par PCR quantitative

2.1.13.1 Méthode de quantification relative

La PCR quantitative (qPCR) est une méthode permettant de mesurer la quantité relative ou absolue d'un ADNc issu d'un transcrit d'ARNm dans un échantillon donné. Un

petit fragment (50 à 200 pb) de cet ADNc est amplifié par PCR grâce à des amorces spécifiques. À chaque cycle d'amplification, un réactif (ici SYBR® Green) s'intercale dans le double brin d'ADN et émet une fluorescence qui peut être mesurée de façon précise. En théorie, il y a à chaque cycle un doublement de la quantité d'ADN double brin et donc un doublement de la fluorescence. C'est la détection et la mesure de cette fluorescence qui permet la quantification de l'ADN cible dans l'échantillon.

Par ailleurs, la quantification relative du niveau d'expression d'un gène cible dans différents échantillons à comparer nécessite de choisir un gène de référence. Ce dernier, également appelé gène de ménage doit être exprimé de façon stable dans tous les tissus de la plante et à tous les stades de développement. Il code généralement pour des protéines essentielles au fonctionnement cellulaire basique (cytosquelette ou enzymes de la voie du glucose par exemple). Ainsi, pour un échantillon donné, le niveau d'expression du gène cible peut être exprimé en fonction de celui du gène de référence qui reste stable, sous forme d'un rapport. Par la suite, ce rapport est normalisé par le rapport cible/référence d'un échantillon que l'on appelle « calibrateur » : c'est la méthode de comparaison des $\Delta\Delta C_T$. La bonne interprétation des résultats dépend, 1) des efficacités des amorces utilisées pour amplifier une partie du gène cible (optimales entre 95 % et 105 %), 2) du ΔC_T entre le gène cible et le ΔC_T du gène de référence (< 10), 3) d'une expression stable et équivalente du gène de référence entre les différents tissus de la plante et les différents stades de maturité étudiés.

Dans ce contexte, il nous fallait tout d'abord choisir un gène de référence chez les agrumes pour pouvoir effectuer la quantification relative d'un gène cible par rapport à ce gène de ménage. Nous avons alors décidé de tester le gène codant pour le facteur d'élongation EF1α chez les agrumes, une protéine impliquée dans l'élongation de la traduction. Ce gène avait déjà été considéré comme un bon gène de référence du fait de son expression stable chez le citrumelo, que ce soit en condition normale ou en condition de stress hydrique (Carvalho *et al.*, 2010). Le gène *EF1α* a également déjà été utilisé comme gène de référence pour déterminer le niveau d'expression relatif de gènes cibles chez l'orange douce et le pomelo, touchés par le chancre bactérien des agrumes (Hu *et al.*, 2014). Par la suite, j'ai dû tester l'efficacité des PCR effectuées sur le gène *EF1α* et sur le gène cible, pour vérifier qu'elles étaient bien proches. Cette vérification doit être menée pour chaque tissu et pour chaque stade de maturité étudiés (cf. paragraphe 2.1.13.3).

2.1.13.2 Préparation des échantillons

Les extractions d'ARN ainsi que la synthèse des ADNc sont décrites dans les paragraphes 2.1.2 et 2.1.3 de cette même partie. Cependant, j'ai préparé les échantillons d'ADNc d'agrumes à partir de 100 ng d'ARN. Je les ai ensuite dilué au cinquième avant de les utiliser lors des qPCR. Dans le cas où je ne les utilisais pas de suite, je les conservais au congélateur à -20 °C.

2.1.13.3 Vérification de l'efficacité des PCR

Pour vérifier l'efficacité des PCR effectuées sur le gène *EF1α* et sur le gène cible, j'ai réalisé des séries de cinq dilutions en cascade sur un échantillon d'ADNc initial de chaque tissu étudié (flavédo, albédo et pulpe) et pour chaque stade de maturité (jeune fruit, fruit à un stade intermédiaire et fruit mûr). J'ai ensuite effectué les qPCR en testant un couple d'amorces pour le gène *EF1α* et deux couples d'amorces (créées à l'aide du logiciel Primer Express, version 3.0) pour le gène cible. J'ai ainsi obtenu une valeur de C_T (nombre de cycles nécessaires pour que le signal fluorescent soit suffisamment intense par rapport au bruit de fond afin de détecter une amplification) pour chaque échantillon et pour chacun des deux gènes. Le logiciel crée ensuite une droite standard représentant les valeurs de C_T obtenues en fonction des quantités en molécules cibles (issues des séries de dilutions d'un échantillon initial). Pour confirmer que le gène *EF1α* est un bon gène de référence, les équations obtenues pour les qPCR effectuées sur les échantillons de différents tissus à différents stades de maturité doivent être très proches. Par ailleurs, le logiciel calcule également l'efficacité de la PCR. Une efficacité de 100 % signifie qu'à chaque cycle de PCR, on a une multiplication par deux du nombre de copies du fragment amplifié. Cette efficacité peut être affectée par, 1) une hybridation non spécifique des amorces sur le matériel génétique (ADNc), 2) la formation de structures en boucles d'amorces, 3) la formation de dimères d'amorces. La qPCR sera d'autant plus précise que les efficacités obtenues pour chaque échantillon initial dilué seront proches, mais aussi que les gènes seront correctement amplifiés (C_T < 30 à 32 généralement).

2.1.13.4 Mélange réactionnel et programme de qPCR

Pour effectuer les qPCR, j'ai utilisé le kit SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) de Takara. Le mélange réactionnel déposé dans un puits contient : 10 µL de SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (2×), 0,2 µM d'amorces sens et antisens, 0,4 µL de ROX Reference Dye (50×), 5 µL d'ADNc et de l'eau ultrapure stérile de façon à compléter le volume à 20 µL. J'ai déposé les échantillons dans des plaques de qPCR (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode 0,1 mL d'Applied Biosystems®) et j'ai recouvert le tout d'un film (MicroAmp® Optical Adhesive Film d'Applied Biosystems®). Après une centrifugation d'une minute à 500 × *g*, j'ai mis la plaque de qPCR dans le thermocycleur StepOnePlus™ Real-Time PCR System d'Applied Biosystems®. Le programme de qPCR est le suivant : 95 °C pendant 30 sec ; puis 40 cycles : 95 °C pendant 5 sec et 60 °C pendant 34 sec. Il est suivi d'une étape permettant de réaliser des courbes de fusion (95 °C pendant 15 sec ; 60 °C pendant 1 min et 95 °C pendant 15 sec). Les courbes de fusion sont utiles pour vérifier la spécificité des qPCR, c'est-à-dire l'amplification d'un seul amplicon. J'ai analysé les résultats de qPCR en utilisant le logiciel StepOne (version 2.3) d'Applied Biosystems®.

2.2 Expression hétérologue d'un gène d'intérêt chez la levure

2.2.1 Préparation de levures compétentes

Avant d'effectuer une transformation de levures, il faut les rendre compétentes. La composition des solutions utilisées est détaillée dans le tableau 10. Le protocole que j'ai suivi est le suivant :

1. Étaler des levures sauvages WAT11 sur une boîte de milieu YPGA et incuber trois jours à 28 °C.
2. Avec une œse, effectuer un prélèvement de levures sur la boîte, inoculer 10 mL de milieu YPGA liquide et incuber 24 h à 28 °C sous agitation à 160 rpm.
3. Répartir deux fois 2 mL de culture de levures sauvages dans deux microtubes stériles de 2 mL et centrifuger 1 min à 1100 × *g*.
4. Éliminer le surnageant et resuspendre les culots dans 200 µL de TEL (composition de la solution indiquée dans le tableau 10).
5. Incuber les deux microtubes de TEL/levures sauvages pendant 10 min à 30 °C.
6. Pendant ce temps, préparer jusqu'à quatre microtubes stériles de 2 mL (pour quatre transformations maximum) contenant :
   - 5 µL de pYeDP60_GW®-gène d'intérêt **OU** 5 µL de pYeDP60_GW® vide (témoin positif), soit 100 à 200 ng de plasmides **OU** 5 µL d'eau stérile (témoin négatif)
   - 2 µL d'ADN de sperme de saumon (concentration de 10 mg/mL) préalablement dénaturé pendant 10 min à 95 °C et conservé sur la glace.
7. Ajouter 100 µL de TEL/levures sauvages aux tubes préparés dans l'étape 6.
8. Ajouter 1 mL de 40 % PEG/TEL à chacun des tubes préparés dans l'étape 7 et vortexer.

	TEL (1 mL)	40 % PEG/TEL (4 mL)
TE 10× stérile (µL)	100	400
AcLi 10× stérile (µL)	100	400
Eau stérile (µL)	800	-
50 % PEG 4000 stérile (µL)	-	3 200

Tableau 10. Composition des solutions utilisées pour la préparation de levures compétentes.

Les volumes de TEL et de 40 % PEG/TEL sont prévus pour quatre constructions.
Pour information :

- TE 10× = Tris à une concentration de 0,1 M ajusté à pH 7,5 à l'acide chlorhydrique et EDTA à une concentration de 10 mM ;
- AcLi 10× = AcLi à une concentration de 1 M ajusté à pH 7,5 à l'acide acétique.

2.2.2 Transformation de levures compétentes

Une fois les levures rendues compétentes, je les ai incubées pendant au minimum 2 h à 30 °C au bain Marie. Il s'agit ensuite d'effectuer un choc thermique pendant exactement 10 min à 42 °C, toujours dans un bain Marie. Un léger repos sur la glace (environ 2 min) des levures est ensuite nécessaire avant de les centrifuger pendant 1 min à 1100 × *g*. Après cela, j'ai éliminé le surnageant et resuspendu le culot à la pipette très délicatement avec 200 µL d'eau stérile. L'étalement sur une boîte de milieu SGI s'effectue en déposant les levures au centre de la boîte et en remuant très doucement. Au bout de trois à cinq jours, des colonies doivent apparaître sur les boîtes contenant les levures transformées avec le pYeDP60_GW®-gène d'intérêt et avec le pYeDP60_GW® vide (témoin positif). En revanche, aucune colonie ne doit avoir poussé sur la boîte contenant les levures « transformées » avec le mélange eau stérile / ADN de sperme de saumon (témoin négatif).

Les levures correctement transformées par les gènes d'intérêt sont conservées sous forme de stocks glycérol au congélateur à -80 °C. Pour cela, j'ai étalé une colonie sur une boîte de milieu YPGA que j'ai mise à incuber pendant au moins trois jours à 28 °C. Après cela, j'ai prélevé les levures à l'œse et je les ai transférées dans un tube contenant un mélange de milieu YPGA liquide et de glycérol stérile (15 %). J'ai ensuite vortexé le tube et je l'ai congelé à l'azote liquide avant de le conserver au congélateur à -80 °C.

2.2.3 Système d'expression hétérologue de cytochromes P450 dans les levures

Les conditions de culture des levures permettant l'expression hétérologue de cytochromes P450 et le protocole de préparation des microsomes de levures ont été adaptés au Laboratoire Agronomie et Environnement à partir des publications de Diesperger et de Pompon (Diesperger *et al.*, 1974 ; Pompon *et al.*, 1996).

2.2.3.1 Conditions de culture

Les milieux de culture de levures évoqués dans ce paragraphe sont détaillés dans le tableau 5. À partir des boîtes de milieu SGI (ou des stocks glycérol) contenant les levures transformées, il est tout d'abord nécessaire de repiquer une colonie sur une nouvelle boîte de milieu SGI et de l'incuber pendant trois jours à 28 °C.

Suite à cela, j'ai lancé une préculture de levures transformées pendant deux jours en milieu liquide sélectif à 28 °C sous agitation à 160 rpm. Le premier jour d'incubation s'effectue dans 10 mL de SGI liquide dans un tube stérile de 50 mL. Le deuxième jour d'incubation s'effectue dans 50 mL de milieu SGI liquide dans un Erlenmeyer stérile de 250 mL. Ces deux étapes permettent l'obtention d'une importante biomasse de levures transformées. En effet, le milieu SGI étant carencé en adénine, seules les levures portant le gène *ADE2* présent sur le pYeDP60_GW® pourront se développer.

Par la suite, j'ai transféré les 50 mL de préculture de levures transformées dans 150 mL de milieu YPGE et j'ai incubé le tout pendant 24 h à 28 °C, sous agitation à 160 rpm. À chaque fois, j'ai étalé par épuisement le peu de préculture qu'il me restait sur une boîte de milieu SGI pour les prochaines mises en culture. Le milieu YPGE est un milieu complet qui permet un bon développement des levures préalablement sélectionnées. Il contient du glucose qui est utilisé comme première source carbonée et de l'éthanol qui est utilisé lorsqu'il n'y a plus de glucose. Lors de cette étape, les promoteurs *GAL10-CYC1* contrôlant l'expression du gène d'intérêt et de la P450 réductase AthR1 sont réprimés par le glucose, empêchant la production de leurs protéines. Ceci s'avère utile dans le cas d'une protéine qui pourrait devenir toxique pour les levures ou fragile à long terme.

La dernière étape consiste à remplacer le milieu YPGE par 200 mL de milieu YPL (après centrifugation 10 min à 7800 × *g* et élimination du surnageant) et à incuber pendant 20 h à 18 °C, sous agitation à 160 rpm. L'élimination du mélange glucose-éthanol et son remplacement par du galactose permet l'induction des promoteurs *GAL10-CYC1* et donc la production des protéines d'intérêt et AthR1. Par ailleurs, le fait d'incuber les levures à 18 °C et non à 28 °C (température optimale de croissance) permet de ralentir leur métabolisme et donc de produire les protéines de façon plus lente, ce qui favorise leur bonne conformation.

2.2.3.2 Préparation des microsomes

La composition des solutions utilisées pour la préparation des microsomes est détaillée dans le tableau 11. J'ai effectué toutes les étapes décrites dans ce paragraphe à 4 °C afin de limiter la dégradation des protéines d'intérêt. Suite à l'incubation des levures dans le milieu YPL, elles doivent être lavées de tout milieu de culture. Pour cela, il faut centrifuger la culture pendant 10 min à 7 800 × *g*, éliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 25 mL de tampon TEK froid. Une nouvelle centrifugation de 5 min à 7000 × *g* permet d'obtenir un nouveau culot de levures tandis que le surnageant est éliminé. Pour lyser les levures, j'ai resuspendu ce culot dans 2,5 mL de tampon d'extraction froid préparé le jour-même (pour quatre constructions : 120 mL de solution TES ; 1,2 g d'albumine de sérum bovin, 144 µL de β-mercaptoéthanol et deux tablettes d'inhibiteur de protéases de chez Roche) en vortexant. J'y ai rajouté des billes de verre de 425-600 µm (Sigma-Aldrich®) jusqu'à ce qu'elles affleurent à la surface du liquide et j'ai agité vigoureusement pendant dix fois 30 sec, en laissant reposer sur la glace 30 sec entre chaque agitation. Par la suite, j'ai récupéré les débris et contenus cellulaires en lavant les billes cinq fois avec 4 mL de tampon d'extraction froid (volume final de 20 mL). Une première centrifugation de 15 min à 15000 × *g* permet de culotter les débris cellulaires et les éventuelles billes restantes. Pour la suite, j'ai réalisé une ultracentrifugation du surnageant (ultracentrifugeuse Sorvall WX80 de Thermo Scientific) pendant 1 h à environ 150 000 × *g* afin de culotter les microsomes de levures. J'ai ensuite éliminé le surnageant et lavé le culot avec 5 mL de solution TEG ensuite éliminés. Finalement, j'ai resuspendu les microsomes de levures dans 4 mL de solution TEG dans un tube Potter à l'aide d'un piston. Je les ai ensuite aliquotés par 500 µL dans des microtubes de 1,5 mL que j'ai stockés à -80 °C.

	TEK	TES	TEG
Tris HCl à pH 7,5	50 mM	50 mM	50 mM
EDTA	1 mM	1 mM	1 mM
KCl	100 mM		
Sorbitol		0,6 M	
Glycérol			30 % (v/v)

Tableau 11. Composition des solutions utilisées pour la préparation des microsomes de levures.

2.3 Méthodes d'analyse des protéines

2.3.1 Électrophorèse sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes

Une fois les microsomes de levures préparés, j'ai vérifié que les protéines d'intérêt étaient bien présentes en commençant par réaliser une électrophorèse sur gel polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Le dodécylsulfate de sodium (SDS) est un détergent fort qui a la capacité de recouvrir les protéines de manière uniforme, ce qui est à l'origine de leur dénaturation totale et leur confère une charge négative. De cette manière, les protéines peuvent ensuite être séparées par un courant électrique en fonction de leur poids moléculaire et non plus de leur charge naturelle.

Avant d'effectuer la migration, il est nécessaire de traiter 40 µL d'échantillon protéique avec 10 µL de tampon de charge (Tris HCl à une concentration de 125 mM et à pH 6,8 ; SDS à 5 % ; Glycérol à 20 % ; β-mercaptoéthanol à 5 % et bleu de bromophénol à 0,05 %) contenant du dithiothréitol (DTT) à une concentration de 400 mM et de chauffer le tout pendant 10 min à 95 °C. Le DTT ajouté au tampon de charge est un agent réducteur fort qui permet de réduire les ponts disulfures présents dans les protéines.

Pour chaque gel, j'ai déposé 10 µL de marqueur de poids moléculaire (Prestrained Protein Molecular Weight Marker ready-to-use #SM0441 de Thermo Scientific) et 20 µL d'échantillon protéique. J'ai ensuite placé le gel dans une cuve contenant le tampon de migration (Tris-Glycine 1× et SDS à 0,1 %, sachant que pour 1 L de tampon Tris-Glycine 10×, il faut 30,4 g de Tris et 144 g de glycine et le pH est ajusté à 8,3), sous un voltage de 150 V pendant environ 50 min. Les protéines migrent d'abord sur un gel de concentration qui permet une entrée homogène des échantillons dans le gel de résolution. Ce dernier permet ensuite la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. La composition des gels de concentration et de résolution est indiquée dans le tableau 12.

	Gel de résolution	Gel de concentration
Tris-HCl 1M pH 8,8	37,7 %	-
Tris-HCl 1M pH 6,8	-	12,5 %
40 % acrylamide	25,1 %	15, 0 %
10 % SDS	1,0 %	1,0 %
10 % APS	1,0 %	1,0 %
TEMED	0,1 %	0,1 %
Eau distillée	35,1 %	70,4 %

Tableau 12. Composition des gels de concentration et de résolution pour le SDS-PAGE.

2.3.2 Transfert des protéines sur une membrane de polyfluorure de vinylidène

Pour révéler les protéines séparées lors du SDS-PAGE, il faut les transférer depuis le gel sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (Amersham™ Hybond™ P 0,45 µm PVDF, GE Healthcare) ayant la capacité de fixer les protéines. J'ai d'abord fait tremper la membrane pendant 5 min dans de l'éthanol absolu. Je l'ai ensuite rincée et mise à tremper pendant 15 min dans du tampon de transfert (Tris-Glycine 1× et éthanol à 20 %) avec du papier filtre (FisherBrand®). Pour le transfert des protéines, le gel est mis en contact ferme avec la membrane, grâce à un montage les entourant de papier filtre et de mousses. Au cours de la migration, les protéines contenues dans le gel et toujours chargées négativement se déplacent de l'anode vers la cathode. Lorsqu'elles rencontrent la membrane au contact du gel, elles y restent fixées. La migration s'effectue dans du tampon de transfert à un voltage de 80 V et dure 45 min. Il est nécessaire d'ajouter un bloc froid dans la cuve pour éviter l'échauffement du tampon.

2.3.3 Western blot

Toutes les étapes décrites dans ce paragraphe sont réalisées à température ambiante. Une fois le transfert des protéines sur la membrane achevé (le marqueur moléculaire permettant de vérifier le transfert), la membrane doit être rincée dans du tampon PBS 1× - Tween (PBS 1× et Tween 20 1 %, sachant que pour 1 L de PBS 10× il faut 87,66 g de NaCl ; 14,24 g de Na_2HPO_4 ; 2,01 g de KCl et 2,04 g de KH_2PO_4 et le pH est ajusté à 7,4). Je l'ai ensuite immergée pendant 10 min sous agitation dans du tampon PBS 1× - Tween contenant 5 % de lait en poudre (v/p). Cette étape permet la fixation des protéines du lait sur la membrane, là où aucune autre protéine n'est présente. Le Western blot étant basé sur l'immunodétection des protéines d'intérêt présentes dans un échantillon, cette étape est indispensable pour limiter le « bruit de fond » qui pourrait être généré par les anticorps qui se fixeraient de manière aspécifique sur la membrane.

Par la suite, j'ai immergé la membrane pendant 1 h 30 sous agitation dans une solution contenant du tampon PBS 1× - Tween avec 5 % de lait en poudre (v/p) et les anticorps

primaires anti-histidines (anticorps Anti-His (C-term) de souris, Novex®) dilués au cinq millièmes. À ce moment, les anticorps primaires reconnaissent et se fixent sur la queue poly histidines artificielle (séquence terminale -His-His-His-His-His-His-COOH) de la protéine. À la fin de cette incubation, la membrane doit être rincée trois fois 10 min dans du tampon PBS 1× - Tween sous agitation.

Après cela, j'ai immergé la membrane pendant 1 h 30 sous agitation dans une solution contenant du tampon PBS 1× - Tween avec 5 % de lait en poudre (v/p) et les anticorps secondaires (Immunoglobulines de type G anti-souris liées à la phosphatase alcaline, Sigma-Aldrich®) dilués au deux millièmes. Les anticorps secondaires se fixent sur les anticorps primaires. Il faut ensuite rincer de nouveau la membrane sous agitation avec du tampon PBS 1× - Tween pendant deux fois 20 min.

Pour la révélation, la membrane doit être immergée pendant deux fois 10 min dans une solution de Tris-NaCl (Tris à une concentration de 0,1 M et NaCl à une concentration de 0,1 M à pH 9,6) sous agitation. Ensuite je l'ai mise au contact d'une solution contenant 10 mL de Tris-NaCl à une concentration de 0,1 M, 37,5 µL de 5-bromo-4-chloro-3-indole-phosphate (BCIP à 50 mg/mL, Roche) et 50 µL de 4-nitroblue tétrazolium chloride (NBT à 100 mg/mL, Roche). Lors de cette incubation, les phosphatases alcalines conjuguées aux anticorps secondaires hydrolysent les groupements phosphates des molécules de BCIP. Les produits qui en résultent sont oxydés par le NBT formant alors un composé violet insoluble qui précipite : le diformazan. La protéine d'intérêt est alors directement visualisable sur la membrane.

2.4 Mesure d'activités enzymatiques

2.4.1 Criblage métabolique initial

Une fois les microsomes de levures préparés, je les ai incubés avec différentes coumarines et furocoumarines dont les structures et caractéristiques sont présentées dans les annexes 3 et 4. Ces substrats ont été préparés sous forme de solution stocks à 1 mM ou à 10 mM dans du méthanol ou du diméthylsulfoxyde (DMSO) et ont été stockés au congélateur à -20 °C.

J'ai effectué chaque incubation dans du tampon phosphate de sodium (NaPi) à une concentration de 0,1 M et en présence et en absence de cofacteur NADPH (tableau 13). Pour préparer le tampon NaPi à une concentration de 0,1 M et à pH 7,5, j'ai fait 2 solutions stocks à 1 M d'acide (A) NaH_2PO_4 et de base (B) Na_2HPO_4. J'ai ensuite mélangé 22,6 mL de (A) avec 77,4 mL de (B) puis j'ai complété avec 900 mL d'eau distillée. Pour les criblages métaboliques initiaux, j'ai fixé le temps d'incubation à 30 min, la température à 28 °C et l'agitation à 600 rpm dans le ThermoMixer® Eppendorf.

	Echantillon test	Témoin négatif
Napi à pH 7,5	0,1 M	0,1 M
Substrat	50 ou 200 µM*	50 ou 200 µM*
NADPH	200 µM	-
Microsomes	40 µL	40 µL

Tableau 13. Composition des milieux d'incubations pour les tests d'activité des microsomes.

* La concentration finale en substrat dépend de celle des solutions stocks. Celles à 10 mM permettent de réaliser des incubations à une concentration finale de 200 µM. Pour celles à 1 mM, la concentration finale de substrat dans le milieu réactionnelle est de 50 µM.

2.4.2 Détermination des constantes cinétiques

Pour déterminer les constantes cinétiques d'une enzyme, il est d'abord nécessaire d'observer l'augmentation de la quantité de produit formé en fonction du temps. En effet, cela nous permet de déterminer un temps d'incubation pour lequel l'accumulation de produit est dans une phase linéaire, ce qui permet de s'affranchir de la variation d'activité de l'enzyme en fonction du temps (inactivation progressive). Pour cela, j'ai effectué des incubations en triplicats avec des temps d'incubation de 30 sec ; 1 min ; 1 min 30 sec ; 2 ; 5 ; 20 ; 40 et 60 min. La composition du milieu d'incubation est identique à celle décrite dans le tableau 13. Pour stopper les réactions, j'ai fait précipiter les protéines en ajoutant 75 µL d'acétonitrile/HCL à 1 % (v/v).

Après cela, j'ai réalisé des incubations en triplicats avec des concentrations croissantes en substrat : 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 ; 15 ; 20 ; 40 ; 60 ; 80 ; 100 ; 200 et 300 µM. Le volume de tampon NaPi a été adapté en fonction de celui du substrat tandis que les volumes de NADPH et de microsomes sont restés inchangés. Le temps d'incubation choisi est déterminé grâce à l'expérimentation décrite dans le paragraphe précédent. De la même manière, j'ai stoppé les réactions en ajoutant 75 µL d'acétonitrile/HCL à 1 % (v/v). Par la suite, le logiciel SigmaPlot (version 12.0) permet de déterminer les constantes cinétiques des enzymes, en suivant le modèle de Michaëlis-Menten. Ce dernier permet de représenter la quantité de produit formée en fonction de la concentration en substrat et donc de déterminer, 1) la vitesse maximale V_m de la réaction enzymatique, 2) la constante d'affinité K_m de l'enzyme, correspondant à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse de la réaction enzymatique est égale à $V_m/2$. Plus la constante d'affinité est faible, plus l'affinité de l'enzyme pour son substrat est forte.

Pour déterminer les quantités de produit formé, j'ai injecté à l'HPLC une gamme étalon de 5-hydroxy-xanthotoxine allant de 0,02 µM à 5 µM (soit de 0,1 pmol à 25 pmol). J'ai ainsi obtenu une droite de calibration reliant l'aire d'un pic de 5-hydroxy-xanthotoxine à sa quantité dans l'échantillon (annexe 5).

2.4.3 Détermination du pH optimum d'activité

J'ai déterminé le pH optimal d'activité des enzymes en effectuant des incubations en triplicats à différents pH : 6,0 ; 6,4 ; 6,8 ; 7,2 ; 7,6 et 8,0. La composition des milieux réactionnels est la même que celle décrite dans le tableau 13, mis à part le pH du tampon NaPi qui varie. Pour préparer le tampon NaPi à différents pH, il faut faire varier les volumes d'acide (A) et de base (B) dans le mélange (tableau 14). De même que pour les criblages métaboliques, j'ai fixé le temps d'incubation à 30 min, la température à 28 °C et l'agitation à 600 rpm dans le ThermoMixer® Eppendorf. J'ai stoppé les réactions en ajoutant 75 µL d'acétonitrile/HCL à 1 % (v/v).

pH	Volume de NaH_2PO_4 (A) à 1 M (mL)	Volume de NA_2HPO_4 (B) à 1 M (mL)
6,0	4,4	0,6
6,4	3,7	1,3
6,8	2,7	2,3
7,2	1,6	3,4
7,6	0,8	4,2
8,0	0,3	4,7

Tableau 14. Préparation du tampon phosphate de sodium (NaPi) à différents pH à une température de 25 °C.

La concentration finale du tampon NaPi est de 0,1 M. Une fois l'acide (A) et la base (B) mélangés, compléter avec 45 mL d'eau distillée.

2.4.4 Détermination de la température optimale d'activité

Pour déterminer la température optimale d'activité des enzymes, j'ai réalisé des incubations en triplicats dont la composition est la même que celle décrite dans le tableau 13. En revanche, j'ai fait varier les températures du milieu qui sont les suivantes : 15 °C ; 20 °C ; 25 °C ; 30 °C ; 35 °C et 40 °C. L'incubation s'est déroulée durant 30 min sous une agitation à 600 rpm dans le ThermoMixer® Eppendorf. J'ai stoppé les réactions en ajoutant 75 µL d'acétonitrile/HCL à 1 % (v/v).

2.5 Méthodes de biochimie

2.5.1 Extractions de phénylpropanoïdes

2.5.1.1 Échantillons d'agrumes

J'ai prélevé des échantillons de peau, de flavédo, d'albédo et de pulpe d'agrumes au niveau des quatre points cardinaux sur les fruits. Pour les échantillons de peau contenant le flavédo et l'albédo, j'ai limité les prélèvements à une épaisseur de 3 à 4 mm, car l'albédo est plus ou moins épais d'une variété d'agrume à l'autre. Après avoir noté le poids frais des

prélèvements, je les ai congelés dans de l'azote liquide puis lyophilisés pendant deux à cinq jours dans un lyophilisateur (Christ Beta 1-8 LD, Christ ou Lyovac® GT2, Steris®). Après cela, j'ai relevé les poids secs de chaque échantillon et je les ai broyés dans un broyeur à billes (MM400, Retsch®) à une fréquence de 30 sec^{-1} pendant 4 min pour les échantillons de peau, de flavédo et d'albédo et 2 min pour les échantillons de pulpe. Les poudres obtenues peuvent être conservées au congélateur à -20 °C en attendant l'extraction.

Le protocole d'extraction de composés polyphénoliques de plantes a été adapté d'après la publication de Royer *et al.* (Royer *et al.*, 2013). Pour chaque extraction, il faut ajouter 850 µL d'une solution de méthanol à 80 % à 20 mg de poudre d'agrume sèche. Cette première extraction est réalisée pendant 1 h dans un agitateur (Reax 2, Heidolph) à mouvement rotatif vertical lent (30 rpm) ou dans le ThermoMixer® Eppendorf à 1400 rpm, qui agite horizontalement. Une première centrifugation de 10 min à 4550 × *g* permet de récupérer le surnageant alors que le culot est de nouveau traité avec 800 µL d'une solution de méthanol à 80 %. La seconde extraction dure 2 min et est effectuée dans le ThermoMixer® Eppendorf à 1400 rpm. Elle est suivie d'une seconde centrifugation de 10 min à 4550 × *g* permettant de récupérer de nouveau un surnageant mélangé au premier. J'ai ensuite fait évaporer les extraits obtenus pendant une nuit dans un concentrateur (Jouan ou Concentrator plus, Eppendorf). Le lendemain, j'ai repris les culots obtenus dans une solution de méthanol à 75 % et j'ai mis à agiter pendant 2 min dans le ThermoMixer® Eppendorf à 1400 rpm. Une dernière centrifugation de 10 min à 13 360 × *g* permet ensuite de culotter les débris restants et de conserver un surnageant propre que j'ai aliquoté dans des vials réducteurs pour HPLC.

2.5.1.2 Échantillons de microsomes de levures

Une fois les incubations de microsomes terminées, j'ai réalisé les extractions des coumarines et furocoumarines présentes dans les mélanges réactionnels à l'acétate d'éthyle. Cette étape permet d'éliminer les protéines et d'éviter de boucher la colonne de l'HPLC lors des analyses biochimiques. Pour cela, j'ai réalisé deux extractions successives en ajoutant 400 µL d'acétate d'éthyle au mélange réactionnel, en agitant 2 min à 1400 rpm dans le ThermoMixer® Eppendorf, en centrifugeant 1 min à 16170 × *g* et en récupérant à chaque fois la phase supérieure. Par la suite, j'ai fait évaporer les échantillons pendant 45 min dans un concentrateur (Concentrator plus, Eppendorf) avant de reprendre le culot dans 100 µL de méthanol pur. Pour homogénéiser le mélange, j'ai réalisé une agitation de 2 min à 1400 rpm dans le ThermoMixer® Eppendorf suivie d'une ultrasonication d'une minute (Elmasonic S70, Elma) avant d'aliquoter dans des vials réducteurs pour HPLC.

2.5.2 Analyses chromatographiques de composés

2.5.2.1 Analyses UPLC-MS des échantillons d'agrumes

Au laboratoire, nous avons effectué les analyses biochimiques sur les extraits d'agrumes en utilisant la chromatographie liquide à ultra haute performance (UPLC) Nexera

de Shimadzu. Elle est équipée d'un détecteur UV (SPDM20A, Shimadzu) et est combinée à un spectromètre de masse à simple quadrupôle (LCMS2020, Shimadzu).

La séparation des composés phénoliques se déroule dans une colonne C18 en phase inverse (ZORBAX Eclipse Plus 150 ou 100 × 2,10 mm ; taille de particule = 1,8 µm ; Agilent Technologies) protégée par une précolonne (1290 Infinity, Agilent Technologies) et thermostatée à 40 °C. La composition des solvants est la suivante : eau ultrapure / 0,1 % d'acide formique (A) et méthanol pur / 0,1 % d'acide formique (B). Le gradient de la phase mobile permettant l'élution des composés est le suivant (A : B ; v/v) : 90 : 10 à 0 min ; 80 : 20 à 0,74 min ; 40 : 60 à 5,88 min ; 10 : 90 à 10 min ; 0 : 100 entre 12 et 16 min et 90 : 10 de 16,01 à 20 min. Les analyses se déroulent à un débit de 0,2 mL/min et le volume d'injection est de 3 µL. Le temps d'analyse total est de 20 min.

La détection des composés phénoliques est réalisée grâce au spectromètre de masse connecté à l'UPLC par une source d'ionisation double (DUIS) fonctionnant en mode positif. Cela implique une combinaison de l'ionisation par électrospray (ESI) et de l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Le voltage appliqué au niveau du capillaire permettant l'ionisation par électrospray est réglé sur 4,5 kV. Les températures du bloc chauffant, de l'entrée et de la ligne de désolvatation du spectromètre de masse sont respectivement réglées à 400 °C, 350 °C et 250 °C. Pour chaque analyte, nous avons optimisé les voltages appliqués au niveau de la ligne de désolvatation et du réseau optique afin d'augmenter la sensibilité de la détection. Pour cela, nous avons injecté chaque standard séparément dans le spectromètre de masse à une concentration de 1 mM. Par ailleurs, nous avons imposé la détection dans un mode permettant le suivi de quelques ions seulement (SIM : Selected Ion Monitoring), ce qui augmente la sélectivité de la méthode.

A la fin des analyses, j'ai retraité les données en utilisant le logiciel LabSolution (version 5.52 sp2, Shimadzu). Pour identifier chaque composé dans les échantillons, nous avions préalablement injecté 3 nmol des différents standards séparément afin de relever leur temps de rétention et leur ratio mass/charge (m/z). Ces informations peuvent être ajoutées dans la méthode de retraitement permettant ensuite l'analyse semi-automatique des données. Quant à la quantification des analytes, elle est réalisée en utilisant une gamme étalon comprenant chacune des molécules étudiées à la même concentration allant de 1 à 30 µM (1, 3, 6, 12, 18, 24 et 30 µM). La quantification des analytes en spectrométrie de masse nécessite tout de même la présence d'un standard interne analytique permettant de normaliser les signaux obtenus. En effet, l'entrée du spectromètre de masse est susceptible de s'encrasser au fur et à mesure des analyses, diminuant alors l'intensité du signal obtenu et donc la répétabilité des mesures. L'angélicine est une furocoumarine angulaire absente chez les agrumes. Par ailleurs, du fait de sa structure, cette molécule est éluée dans une même fenêtre de temps que les autres coumarines et furocoumarines analysées. C'est pour cela que nous avons choisi cette molécule en tant que standard interne analytique et que nous l'avons ajouté dans chacun des échantillons ainsi que dans chacun des points de la gamme étalon à une concentration de 5 µM. Ainsi, pour chacun des composés, une courbe étalon est construite mettant en relation l'aire du pic du composé divisée par l'aire du pic d'angélicine en fonction de la concentration du composé. Chaque courbe est linéaire et passe forcément par zéro.

2.5.2.2 Analyses HPLC-DAD des activités enzymatiques

Pour réaliser les analyses biochimiques des différentes incubations de microsomes, j'ai utilisé une chromatographie liquide à haute performance (Prominence, Shimadzu) couplée à un détecteur UV (SPD-M20A, Shimadzu), aussi appelé détecteur à barettes de diodes (HPLC-DAD). La séparation des molécules s'effectue sur une colonne C18 en phase inverse (Lichrospher® OD2 250 × 4,0 mm ; taille de particule = 5 µm, Interchim) protégée par une précolonne (taille de particule = 5 µm, Interchim). La composition des solvants est la suivante : eau ultrapure / 0,1 % d'acide formique (A) et méthanol pur / 0,1 % d'acide formique (B). Les composés sont élués par la phase mobile dont le gradient est le suivant (A : B ; v/v) : 90 : 10 jusqu'à 3 min ; 1 : 99 à 34 min ; 90 : 10 de 38 à 43 min. Les analyses sont effectuées à un débit de 0,7 mL/min et le volume d'injection est de 20 µL pour les échantillons et 5 µL pour les standards. Le temps d'analyse total est de 43 min. La détection des composés est réalisée par le détecteur UV sur des longueurs d'onde entre 200 et 600 nm.
À la fin des analyses, j'ai retraité les données en utilisant le logiciel LC Solution (version 1.23 SP1). J'ai ainsi extrait chaque chromatogramme à la longueur d'onde maximale du substrat (dans le cadre des analyses de criblages métaboliques) ou du produit (dans le cadre de l'étude des paramètres catalytiques enzymatiques). J'ai pu identifier les produits formés en comparant leur temps de rétention et leur spectre d'absorbance à ceux de standards commerciaux.

2.5.2.3 Analyses LC-MS/MS des activités enzymatiques

Après avoir identifié une activité enzymatique en HPLC, j'ai voulu confirmer les résultats en analysant les échantillons en chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Cette méthode permet d'obtenir les spectres de fragmentations des produits formés et donc d'identifier un composé de façon beaucoup plus fiable. J'ai donc confié les échantillons à Jérémy Grosjean, Ingénieur d'études analyste au LAE. Le plateau d'analyses structurales et métabolomiques de l'ENSAIA (Vandœuvre-Lès-Nancy) dispose en plus de l'UPLC-MS et de l'HPLC-DAD d'un système LC-MS/MS. L'appareil de chromatographie liquide (Dionex UltiMate® 3000, Thermo Scientific) est couplé à un spectromètre de masse en tandem (LTQ XL™ Linear Ion Trap Mass Spectrometer, Thermo Scientific). La séparation des molécules s'effectue sur une colonne C18 en phase inverse (Alltima™ 150 × 2,1 mm ; taille de particule = 5 µm, Alltech®). La composition des solvants est la suivante : eau ultrapure / 0,1 % d'acide formique (A) et méthanol pur / 0,1 % d'acide formique (B). La phase mobile évolue selon le gradient d'élution suivant (A : B ; v/v) : 90 : 10 à 0 min ; 43 : 57 à 20 min ; 35 : 65 à 32 min ; 10 : 90 entre 36 min et 38,50 min ; 90 : 10 de 38,51 à 40 min. Les analyses se déroulent à un débit de 0,2 mL/min et le volume d'injection est de 20 µl. Le temps d'analyse total est de 40 min.

Le spectromètre de masse en tandem est muni d'une trappe ionique permettant la distinction des composés en fonction de leur ratio m/z. Il est connecté à la chromatographie liquide par une source d'ionisation ESI fonctionnant en mode positif. Le voltage et la température appliqués au niveau du capillaire de l'ESI sont de 4,5 kV et 300 °C respectivement. Les débits des gaz coaxial, auxiliaire et barrière sont respectivement réglés à

40, 10 et 10 unités arbitraires (UA)/min. À l'entrée du spectromètre de masse, les voltages du capillaire de transfert, du split lens et du front lens sont respectivement réglés à 36 V, -44 V et -3,5 V. L'analyse des composés est réalisée par un scan complet des ratios m/z entre 50 et 1000, mais aussi par le suivi de certains m/z spécifiques correspondants aux substrats et aux produits attendus.

À la fin des analyses, les données sont retraitées en utilisant le logiciel Xcalibur™ (version 2.1.SP1.Build1160). Les produits formés peuvent être identifiés par comparaison des temps de rétention et des spectres de fragmentation à ceux de standards commerciaux.

2.6 Modélisation de CYP82D64

Les modélisations structurales tridimensionnelles (3D) de CYP82D64 de pomelo et de Combava ont été effectuées par le docteur Dave Ritchie du Laboratoire Lorrain de Recherche en Informatique et ses Applications (LORIA, Vandœuvre-Lès-Nancy), en utilisant les logiciels KPAX (version 4.0) et MODELLER (version 9.13). Les structures 3D sont proposées à partir d'une banque de données préexistante (Protein Data Bank (PDB) : http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do) contenant les structures protéiques connues de diverses protéines. L'alignement des séquences protéiques des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava a permis d'identifier la protéine présentant le meilleur score d'alignement qui est un cytochrome P450 humain : CYP17A1 (Protein Data Bank (PDB) code : 3SWZ), catalysant la synthèse de molécules androgènes. À partir de ces données, le docteur Dave Ritchie a proposé une structure 3D pour chacun des CYP82D64, incluse dans un fichier au format .pdb.

Suite à ce premier travail de modélisation 3D des deux protéines, le docteur Bernard Maigret du LORIA a effectué le docking de la xanthotoxine et de l'herniarine dans les sites actifs des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava, en utilisant les logiciels GOLD (version 5) et LIGPLOT (version 4.5.3). Les fichiers contenant les ligands au format .pdb doivent être convertis en .mol2 pour faire fonctionner le logiciel GOLD. Par ailleurs, il est aussi nécessaire d'ajouter les protons aux deux enzymes et de calculer le centre de gravité du site actif. Le logiciel GOLD permet d'obtenir des fichiers pour lesquels les poses des substrats dans le site actif sont les meilleures. Ces fichiers peuvent ensuite être utilisés dans le logiciel LIGPLOT afin de visualiser ces poses.

2.7 Traitements statistiques des données

Les données d'identification et de quantification en UPLC-MS des coumarines et furocoumarines dans les divers tissus de fruits d'agrumes ont été soumises à différentes analyses statistiques :

- des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées avec le logiciel XLSTAT 2012 ;
- des tests d'analyse de la variance (ANOVA) ont été effectués avec le logiciel StatPlus version 5.9.0.6. Ils permettent de vérifier si les valeurs moyennes obtenues pour des échantillons sont significativement différentes (p-value < 0,05) ou non (p-value > 0,05).

Chapitre III :
Résultats et discussion

Partie I :

Création, optimisation et validation d'une méthode d'analyse en UPLC-MS de 28 coumarines et furocoumarines dans des échantillons de peau et de pulpe d'agrumes

Publication n°1 :

Dugrand, A., Olry, A., Duval, T., Hehn, A., Froelicher, Y. and Bourgaud, F. (2013) Coumarin and furanocoumarin quantitation in citrus peel via ultraperformance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS). *J. Agric. Food Chem.*, 61, 10677-10684.

La première partie de mon travail concerne la création, l'optimisation et la validation d'une méthode d'analyse en UPLC-MS de 28 coumarines et furocoumarines dans des extraits de peau et de pulpe d'agrumes. Elle a en partie fait l'objet d'une publication dans le *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, qui est présentée ci-après. J'indique ici la contribution des différents auteurs au travail décrit dans cette première partie :

- Création et optimisation de la méthode UPLC-MS pour l'analyse, dans un premier temps, de 27 coumarines et furocoumarines dans des échantillons de peau d'agrumes : Audray Dugrand, Alexandre Olry, Thibault Duval ;
- Validation de la méthode UPLC-MS pour l'analyse de ces 27 coumarines et furocoumarines dans des échantillons de peau d'agrumes : Audray Dugrand, Thibault Duval ;
- Validation de la méthode UPLC-MS pour l'analyse de ces 27 coumarines et furocoumarines dans des échantillons de pulpe d'agrumes : Audray Dugrand ;
- Validation de la méthode UPLC-MS pour l'analyse d'un vingt-huitième composé : la 5-hydroxy-xanthotoxine dans des échantillons de peau et de pulpe d'agrumes : Audray Dugrand ;
- Retraitement des données sur la peau des agrumes : Audray Dugrand ;
- Analyse des résultats sur la peau des agrumes : Audray Dugrand, Frédéric Bourgaud ;
- Rédaction de l'article publié : Audray Dugrand, Alexandre Olry, Thibault Duval, Alain Hehn, Yann Froelicher, Frédéric Bourgaud.

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Partie I : Création, optimisation et validation d'une méthode d'analyse en UPLC-MS de 28 coumarines et furocoumarines dans des échantillons de peau et de pulpe d'agrumes

Les travaux menés par l'équipe « Métabolites secondaires » du LAE consistent à mieux comprendre la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les plantes en produisant. En particulier, dans le cadre de mon doctorat, ce travail portait sur les agrumes. Nous avions à disposition des banques d'ADNg de *C. sinensis* (oranger doux) et de *C. clementina* (clémentinier), nous donnant accès à des séquences de gènes. Nous connaissions également les séquences de gènes impliqués dans la synthèse de coumarines et furocoumarines chez d'autres plantes. Nous pouvions donc dresser une liste de gènes d'agrumes présentant des homologies de séquences avec ceux déjà caractérisés chez d'autres plantes. Cependant, il existe une très grande diversité de métabolites secondaires et de familles enzymatiques impliquées dans leur synthèse. Il n'était donc pas envisageable, au cours de mon doctorat, de cloner et d'exprimer tous les gènes candidats identifiés, ainsi que de réaliser le criblage métabolique des enzymes associées. Nous avons donc envisagé une stratégie consistant à réaliser une analyse différentielle de l'expression de ces gènes candidats, chez des agrumes produisant peu ou beaucoup de coumarines et furocoumarines. Nous comptions ainsi réduire le nombre de ces gènes candidats. Dans ce contexte, il nous fallait dans un premier temps mettre au point une méthode analytique pour chémotyper différentes variétés d'agrumes. Grâce à un partenariat avec la station de recherche INRA/CIRAD de San Giuliano en Corse, nous disposions de plus de 1000 espèces représentatives de leur diversité génétique.

Nous nous sommes donc tournés vers la création d'une méthode analytique utilisant la chromatographie liquide à ultra haute performance (UPLC), permettant la séparation des composés dosés, couplée à la spectrométrie de masse (MS), permettant la détection et la quantification de ces composés. L'objectif était d'obtenir une méthode fiable (spécifique, précise, juste et robuste), sensible (car les teneurs en métabolites secondaires sont faibles), mais surtout rapide, afin de pouvoir réaliser une large analyse des accessions dont nous disposions.

Les paragraphes suivants résument la création, l'optimisation et la validation de cette méthode d'analyse en UPLC-MS de 28 coumarines et furocoumarines dans des extraits de peau et de pulpe d'agrumes. J'y ai inclus l'article associé (paragraphe 1.4), publié dans le *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

1.1 Création et optimisation de la méthode analytique en UPLC-MS avec des standards commerciaux

1.1.1 Séparation des composés en UPLC

Plusieurs méthodes ont déjà été créées pour l'analyse de coumarines et/ou furocoumarines chez les agrumes. Cependant, certaines méthodes de détection (ex : UV, fluorescence) couplées à la séparation en chromatographie liquide nécessitent la séparation totale de tous les composés à doser. Il en résulte des méthodes analytiques très longues (ex : 60 min pour séparer quinze furocoumarines, Frérot et Decorzant, 2004), ou ne pouvant doser que quelques composés (ex : 4,5 min pour séparer deux furocoumarines, Vandermolen *et al.*, 2013). Il n'est alors pas envisageable de les utiliser sur un grand nombre d'échantillons ou pour doser une grande diversité de composés. L'émergence de nouvelles méthodes analytiques basée sur l'utilisation de la chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse ouvre de nouvelles perspectives. Outre la rapidité d'analyse permise par l'UPLC, le spectromètre de masse est un outil de détection et de quantification ne nécessitant pas la séparation physique de tous les composés à doser. Il peut en effet les distinguer grâce à leur ratio masse sur charge (m/z), ce qui signifie que seuls les isomères doivent être séparés pour obtenir des résultats de quantification fiables. Ainsi, deux composés qui coéluent en UPLC mais qui ont des m/z différents sont facilement distingués en spectrométrie de masse et leur quantification peut être faite sans ambiguïté.

Nous avons donc mis au point une méthode de séparation en UPLC de 28 composés et du standard interne analytique (rôle expliqué dans le paragraphe 1.1.2.2), visant en particulier à séparer les 18 isomères (structures des composés décrites dans la figure 1 de la publication n°1). Pour commencer, nous disposions d'une méthode d'analyse de flavonoïdes d'une durée de 90 min en HPLC, que nous avons modifiée pour l'adapter à nos attentes. Nous avons donc testé différents gradients d'élution (figure 26) pour séparer les composés à doser et le standard interne analytique préparés dans un échantillon à partir de standards commerciaux.

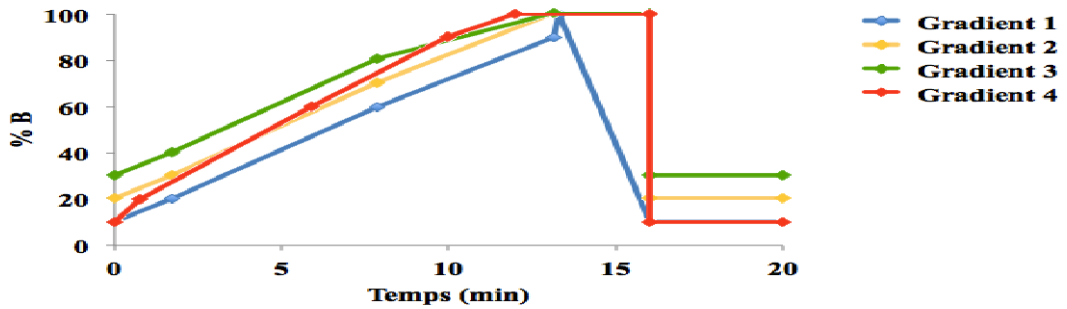


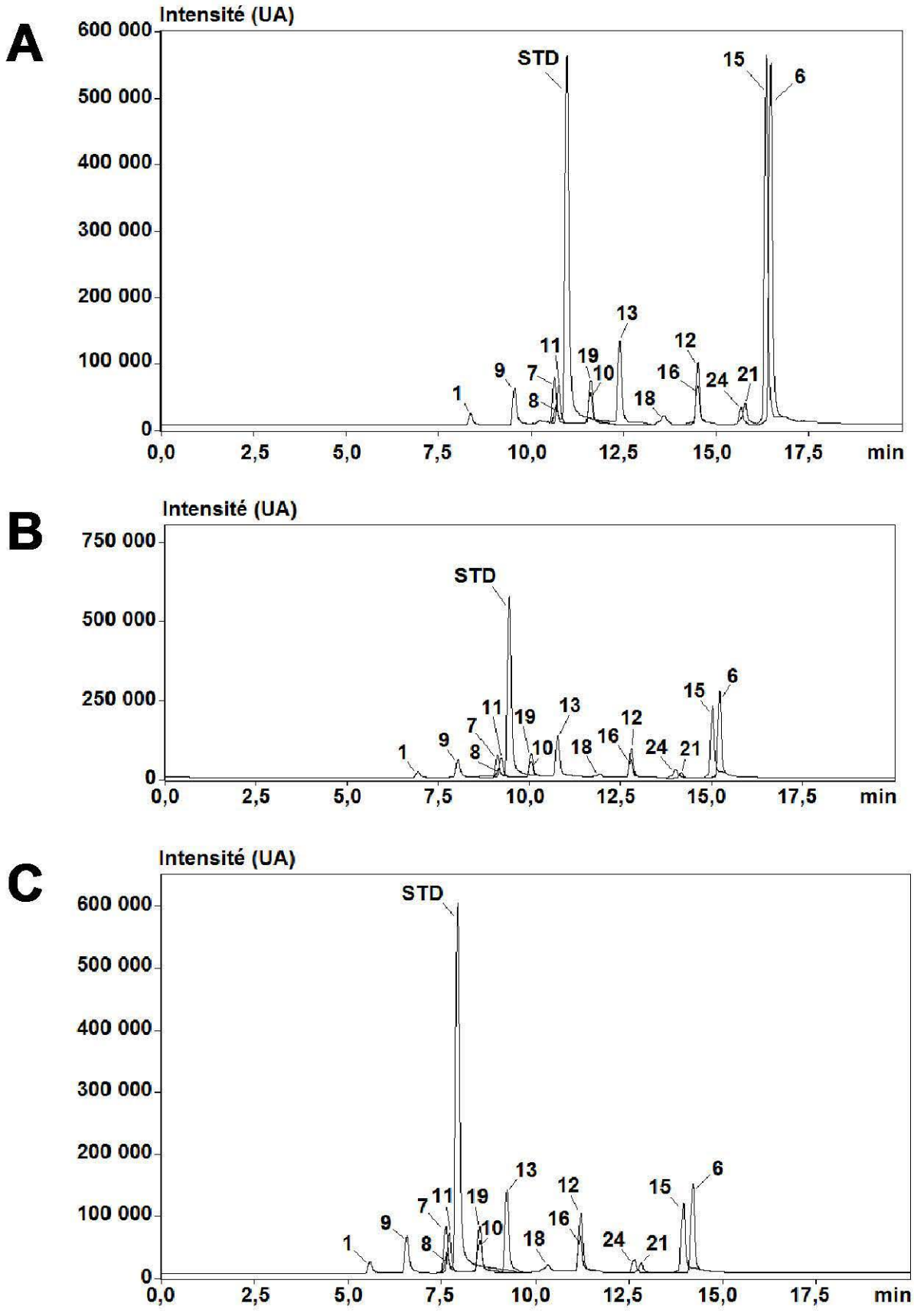
Figure 26. Gradients d'élution testés pour la séparation des coumarines et furocoumarines en UPLC.

Nous avons fixé le débit d'analyse à 0,2 mL/min. Les gradients 1, 2 et 3 diffèrent principalement par la composition de la phase mobile en début d'analyse (pourcentage de solvant B, composition des solvants décrite dans la section « Matériel et méthodes »). Pour le gradient 4, le pourcentage de solvant B augmente plus rapidement (pente plus forte). Une cinquième méthode de séparation testée reprenait le gradient d'élution 1 à un débit de 0,3 mL/min.

Globalement, tous les gradients d'élution testés ont permis, dans un premier temps, de séparer correctement 14 isomères (figure 27). Les méthodes de séparation sont donc toutes résolutives. En revanche, le gradient 4 dont la phase mobile évolue plus rapidement que les autres gradients permet une séparation plus rapide des différents composés (figure 27-D). En effet, sept minutes s'écoulent entre l'élution de l'umbelliférone (premier composé) et celle de la 5-géranyloxy-7-méthoxycoumarine (dernier composé) avec le gradient 4 et plus de huit minutes avec les autres gradients (figure 27). En utilisant le gradient 4, nous disposons donc d'une minute supplémentaire après la séparation des composés, ce qui permet un meilleur nettoyage de la colonne avant qu'elle ne soit rééquilibrée. Cet avantage n'est pas négligeable dans la mesure où les échantillons d'agrumes analysés correspondent à des matrices complexes contenant beaucoup de phénylpropanoïdes. Nous avons donc choisi de garder le gradient d'élution 4 pour la méthode de séparation des coumarines et furocoumarines.

Nos attentes ayant évolué au cours de mon doctorat, nous n'avons pas cessé d'améliorer et d'optimiser la méthode d'analyse en UPLC-MS de coumarines et furocoumarines dans des extraits d'agrumes. En particulier, nous avons ajouté trois composés à doser : la cnidiline (isomère de la phellopérine), l'héraclénol (isomère de l'oxypeucédanine hydrate) et la 5-hydroxy-xanthotoxine. Nous avons donc dû vérifier les temps de rétention de ces composés dans la colonne de l'UPLC, notamment pour les isomères supplémentaires. Ainsi, le gradient 4 permet toujours une bonne séparation de tous les isomères, même avec l'ajout de la cnidiline et de l'héraclénol (figure S1 de la publication n°1).

Pour l'ajout de la 5-hydroxy-xanthotoxine à la méthode initiale, il me fallait seulement vérifier qu'elle n'était pas éluée en tout début ou en toute fin d'analyse, mais bien avec les autres composés. En effet, la 5-hydroxy-xanthotoxine présente un m/z différent de tous les autres composés dosés. Par ailleurs, nous avions entre-temps modifié la colonne de l'UPLC, dans le cadre de l'amélioration continue de notre méthode analytique. Les deux colonnes utilisées différaient juste par leur longueur : 15 cm pour la première et 10 cm pour la seconde, de sorte que seuls les temps de rétention des composés en ont été affectés. Ainsi, l'utilisation de la seconde colonne a permis de réduire encore les temps de rétention de 0,6 min environ pour chaque composé, tandis que la phase de lavage de la colonne était rallongée. Le temps de rétention de la 5-hydroxy-xanthotoxine dans la seconde colonne était de 7,98 min (figure 28 et tableau 15), ce qui ne nécessitait pas d'effectuer de modification de la méthode de séparation en UPLC.


A
Intensité (UA)
600 000
500 000
400 000
300 000
200 000
100 000
0
STD
15
6
13
11
12
19
9
7
10
16
24
21
1
8
18
0,0
2,5
5,0
7,5
10,0
12,5
15,0
17,5
min
B
Intensité (UA)
750 000
500 000
250 000
0
STD
15
6
11
19
13
7
12
9
16
1
8
10
18
24
21
0,0
2,5
5,0
7,5
10,0
12,5
15,0
17,5
min
C
Intensité (UA)
600 000
500 000
400 000
300 000
200 000
100 000
0
STD
13
6
12
15
7
11
19
9
16
10
1
8
18
24
21
0,0
2,5
5,0
7,5
10,0
12,5
15,0
17,5
min

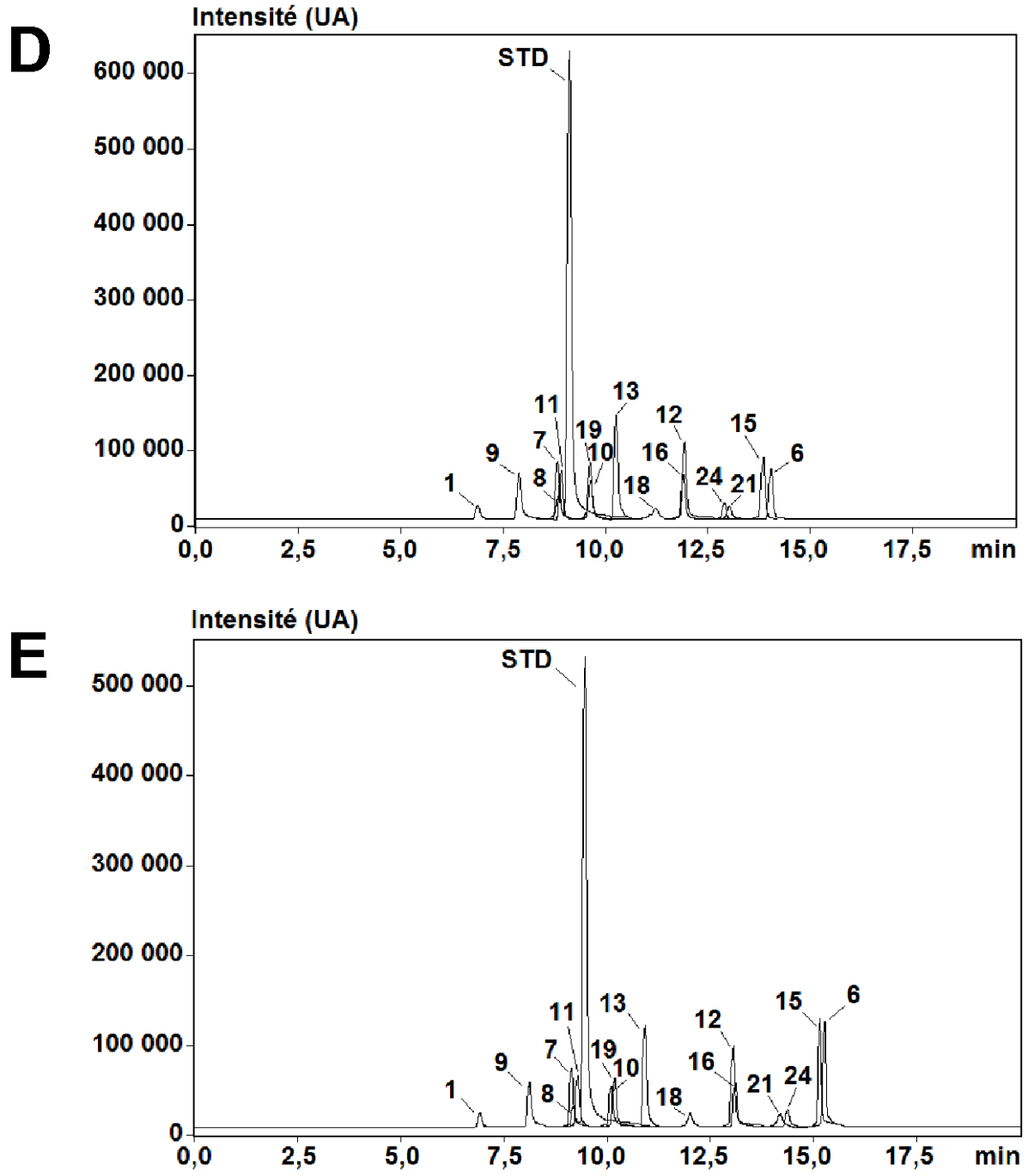


Figure 27. Spectres de masses d'un mélange de standards commerciaux après séparation en UPLC, suivant différents gradients d'élution.

(A) Gradient d'élution 1 (figure 26), débit de 0,2 mL/min ; (B) Gradient d'élution 2 (figure 26), débit de 0,2 mL/min ; (C) Gradient d'élution 3 (figure 26), débit de 0,2 mL/min ; (D) Gradient d'élution 4 (figure 26), débit de 0,2 mL/min ; (E) Gradient d'élution 1 (figure 26), débit de 0,3 mL/min. STD : Standard interne analytique. Les correspondances entre composés et numéros de pics sont indiquées dans la figure 1 de la publication n°1. Pour plus de clarté sur cette figure, je n'ai représenté que les premier (1 : umbelliférone) et dernier (6 : 5-géranyloxy-7-méthoxycoumarine) composés élués ainsi que les 14 premiers isomères testés. La colonne utilisée est : ZORBAX Eclipse Plus 150 × 2,10 mm ; taille de particule = 1,8 µm ; Agilent Technologies.

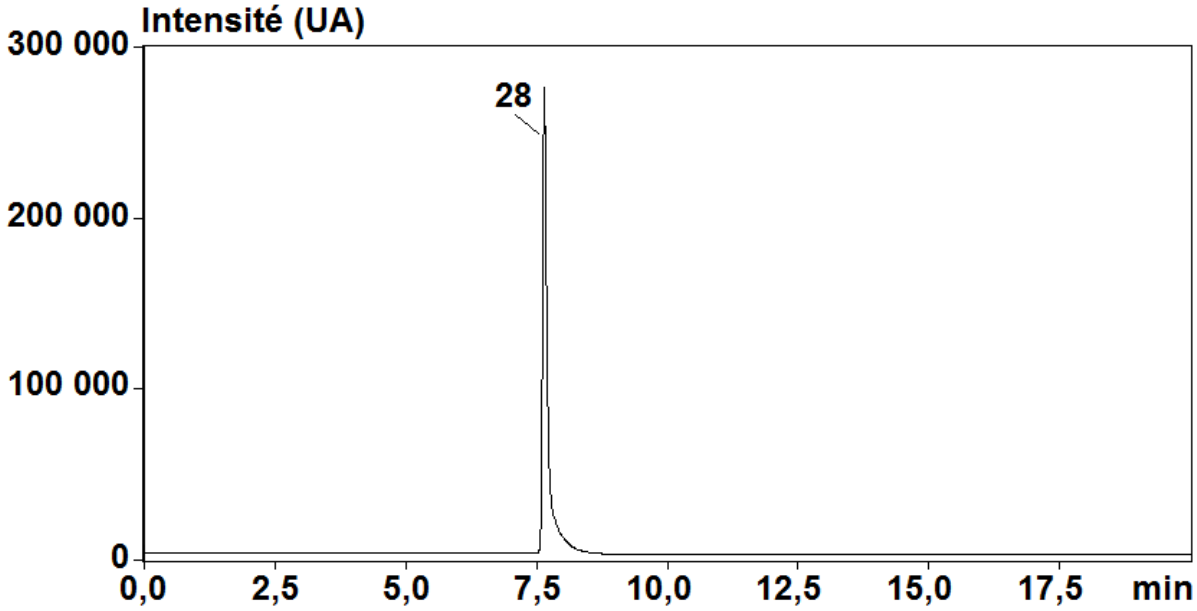


Figure 28. Spectre de masse de la 5-hydroxy-xanthotoxine (composé n°28) après séparation en UPLC.

Pour information, la méthode de séparation utilisée suit le gradient 4 à un débit de 0,2 mL/min. La colonne utilisée est : ZORBAX Eclipse Plus 100 × 2,10 mm ; taille de particule = 1,8 µm ; Agilent Technologies.

1.1.2 Détection et quantification des composés en spectrométrie de masse

Les coumarines et furocoumarines ont des structures très proches et sont donc susceptibles de coéluer dans l'UPLC. Ce défaut de résolution entraîne des chevauchements au niveau des pics des composés lors de la détection UV et donc des erreurs lors de leur quantification (Frérot et Decorzant, 2004). Pour résoudre ce problème, nous avons choisi d'effectuer la détection et la quantification des composés en spectrométrie de masse. En effet, cet outil permet la distinction de composés qui coéluent, pourvu que ce ne soit pas des isomères, ce qui rend la méthode rapide (gradient d'élution court) et fiable (bonne résolution).

1.1.2.1 Détection

La détection des composés dans le spectromètre de masse peut être optimisée en augmentant la sensibilité et la sélectivité de la méthode. Ceci est très appréciable lorsque les composés se trouvent en faibles quantités dans les échantillons et lorsque les matrices analysées contiennent beaucoup d'impuretés (ex : extraits bruts de végétaux).

Sensibilité de la méthode : Elle peut être améliorée en modifiant le mode d'ionisation au niveau de l'interface entre l'UPLC et le spectromètre de masse (figure 29). L'analyse d'un grand nombre de composés implique de trouver un compromis quant à la source d'ionisation choisie, dans le but d'optimiser la détection. Ainsi, nous avons remarqué que l'ionisation des molécules en mode DUIS positif était la meilleure solution à choisir au niveau de l'interface

UPLC-MS. La sensibilité de la méthode peut également être améliorée en modifiant les voltages appliqués au niveau de l'entrée du spectromètre de masse (ligne de désolvatation et réseau de lentilles Qarray®) (figure 29). Pour chaque molécule, nous avons donc déterminé les voltages optimaux, permettant d'obtenir le signal le plus élevé dans le spectromètre de masse (tableau 3 de la publication n°1 et tableau 15 pour la 5-hydroxy-xanthotoxine).

	Ion	Masse molaire (g/mol)	m/z	t_R (min)	DL (V)	Qarray (V)
5-hydroxy-xanthotoxine **(28)**	$[M + H]^+$	232	233	7,98	80	0

Tableau 15. Caractéristiques de la 5-hydroxy-xanthotoxine ajoutée ultérieurement à la méthode UPLC-MS.

Ion formé, masse molaire (g/mol), ratio m/z lors de l'analyse MS, temps de rétention dans la colonne de l'UPLC (min) et voltages appliqués au niveau de la ligne de désolvatation (DL) et du réseau de lentilles Qarray® (V) pour l'optimisation de la détection MS.

Sélectivité de la méthode : Elle peut être améliorée en utilisant le mode SIM au niveau du quadripôle (analyseur m/z) (figure 29). Celui-ci permet en effet d'éliminer les ions présentant des m/z différents de ceux recherchés. Nous avons donc paramétré l'analyseur de sorte qu'il ne recherche que les m/z des composés analysés (soit 20 valeurs au total puisqu'il y a 18 isomères), ce qui nous a permis d'augmenter la sélectivité de la méthode.

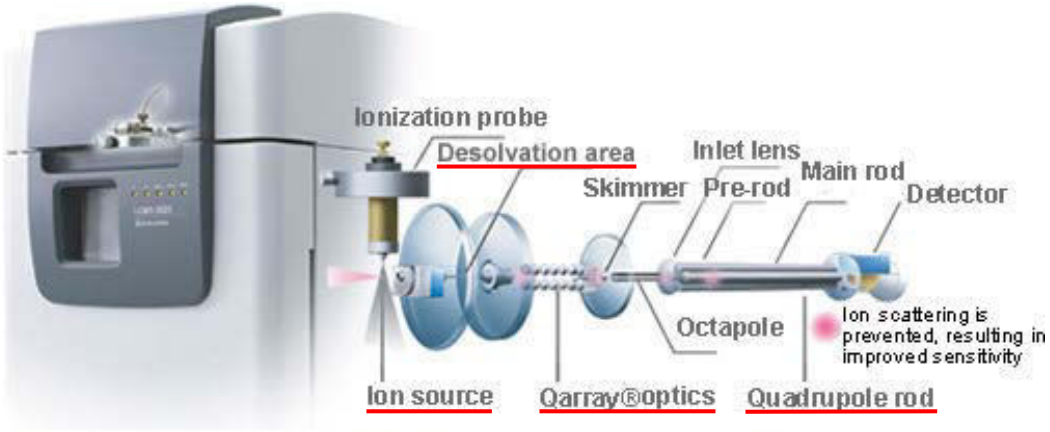


Figure 29. Composants du spectromètre de masse intervenant dans l'optimisation de la détection des composés à doser.

Image : http://www.shimadzu.com.

1.1.2.2 Quantification

Une fois les composés détectés, nous obtenons un spectre de masse composé de pics de différentes intensités. Pour les quantifier, nous avons utilisé une gramme étalon constituée de sept points allant de 1 à 30 µM. Cependant, au cours d'une longue analyse, la source d'ionisation peut s'encrasser, diminuant alors l'intensité du signal et rendant la méthode non répétable. Pour résoudre ce problème, nous avons utilisé un standard interne analytique,

permettant d'homogénéiser les signaux obtenus. Il s'agit de l'angélicine, une furocoumarine angulaire absente chez les agrumes, mais présentant une structure proche des autres composés dosés. Nous avons ajouté ce composé à tous les échantillons ainsi qu'à tous les points de la gamme étalon à une concentration de 5 µM. Les droites de calibrations obtenues permettent ainsi de faire correspondre une aire de pic relative à une concentration.

1.2 Validation de la méthode analytique avec des standards commerciaux et des échantillons de peau d'agrumes

Toute nouvelle méthode analytique se doit d'être correctement validée avant de pouvoir être utilisée. Aujourd'hui, de nombreuses instances recommandent fortement voire imposent la validation des méthodes utilisées en laboratoire. Par exemple, l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) propose des directives quant à la validation de méthodes analytiques dans le domaine des sciences et de la recherche (FDA, 2015). Plus proche de nous, l'INRA demande maintenant, dans le cadre d'une démarche qualité, de valider les méthodes analytiques utilisées en laboratoire par le profil d'exactitude (Huyez-Levrat, 2010). Dans ce contexte, nous avons suivi une démarche de validation de notre méthode d'analyse en UPLC-MS de coumarines et furocoumarines dans des extraits d'agrumes. Cette validation s'appuie sur six paramètres à évaluer avec des standards commerciaux, mais aussi avec des échantillons biologiques, correspondant aux différentes matrices analysées (ex : peau ou pulpe d'agrumes). De cette façon, la méthode analytique peut ensuite être utilisée de façon fiable sur des extraits végétaux bruts. Dans cette partie, les échantillons de peau d'agrumes ont été préparés tel que décrit dans la section « Matériel et méthodes ».

1.2.1 Paramètres indépendants des échantillons biologiques

Parmi les six paramètres de validation d'une méthode analytique, la linéarité, la précision, la justesse et la robustesse sont ceux qui ne dépendent pas des échantillons biologiques. Il n'est donc pas nécessaire de les évaluer sur différents types de matrices pour pouvoir utiliser la méthode. En revanche, l'ajout d'un nouveau composé à doser dans la méthode (ici la 5-hydroxy-xanthotoxine) implique nécessairement la détermination de sa linéarité et de sa justesse pour le composé en question.

Linéarité : Ce premier point consiste à vérifier que l'aire relative du pic de chaque composé est proportionnelle à sa concentration. Pour cela, nous avons injecté notre gamme étalon préparée à partir de standards commerciaux à différentes concentrations (ici sept points, sachant qu'il en faut au minimum cinq), allant de 1 à 30 µM. Une régression linéaire nous a ensuite permis de calculer un coefficient de corrélation (r^2) indiquant une bonne ou mauvaise linéarité pour chacun des composés dosés. Dans notre cas, tous les composés montrent une bonne linéarité ($r^2 > 0,99$) (tableau 1 de la publication n°1 et tableau 16). Il est à noter que les valeurs quantifiées par la méthode analytique pour un composé donné sont fiables sur son domaine de linéarité uniquement. Un échantillon comprenant des composés dont la

quantification dépasse le domaine de linéarité doit impérativement être dilué et analysé de nouveau.

	Linéarité		Justesse (µM)	
	Équation	r^2	Moyenne	Écart-type
5-hydroxy-xanthotoxine **(28)**	43172,2 x + 0	0,9941	8,18	0,86

Tableau 16. Linéarité et justesse de la 5-hydroxy-xanthotoxine dosée par la méthode UPLC-MS.

Pour information, le dosage de la 5-hydroxy-xanthotoxine s'effectue grâce à un étalonnage externe contrairement aux autres composés dosés (cf. paragraphe sur la justesse).

Précision : Une méthode analytique est dite précise (ou fidèle) si les valeurs de quantification obtenues pour un composé restent inchangées quelles que soient les conditions. Pour un échantillon donné, les différentes valeurs quantifiées permettent de calculer une moyenne (σ) et un écart-type (μ) permettant à leur tour d'obtenir un coefficient de variation ($c_v = \sigma/\mu$), jugeant de la précision de la méthode. La précision ne doit pas nécessairement être évaluée pour tous les composés dosés. Nous l'avons vérifié pour sept coumarines et furocoumarines quantifiables dans des extraits de peau de citron Eurêka (*C. limon*). Il existe trois « niveaux » de précision : la répétabilité, la précision intermédiaire et la reproductibilité. La répétabilité indique qu'un même échantillon analysé plusieurs fois de suite donne les mêmes résultats de quantification. Dans notre cas, la méthode est répétable avec des c_v généralement inférieurs à 10 % (tableau 2 de la publication n°1). La précision intermédiaire évalue par exemple l'impact du temps (différents jours) ou d'un opérateur sur les valeurs quantifiées par une méthode analytique. Nous avons effectué ici la quantification de sept composés dans un même échantillon, sur trois jours différents. La méthode montre une bonne précision intermédiaire avec des c_v généralement inférieurs à 20 % (tableau 2 de la publication n°1). Enfin, la reproductibilité concerne l'utilisation d'une méthode sur un même échantillon dans différents laboratoires équipés du même système analytique. Ce dernier paramètre étant très difficile à mettre en œuvre, il ne doit pas nécessairement être vérifié. Dans notre cas, nous n'avons pas pu déterminer la reproductibilité de la méthode.

Justesse : Une méthode analytique est dite juste si les valeurs de quantification obtenues expérimentalement correspondent aux quantités réelles des composés dans l'échantillon. Elle doit être évaluée dans une matrice complexe, correspondant à des extraits végétaux bruts. Nous avons donc choisi d'utiliser des extraits de feuilles de tomate (*Solanum lycopersicum*, six échantillons préparés selon le protocole d'extraction décrit dans la section « Matériel et méthodes », comme pour les échantillons d'agrumes), qui contiennent beaucoup de phénylpropanoïdes, excepté les coumarines et furocoumarines dosées par notre méthode. Ces dernières y ont été ajoutées à une concentration connue de 7,5 µM, afin d'évaluer la justesse de la quantification dans une matrice complexe. Les valeurs quantifiées par la méthode UPLC-MS étant proches de cette concentration connue, nous pouvons dire que la méthode est juste (tableau 1 de la publication n°1 et tableau 16). Néanmoins, pour la 5-hydroxy-xanthotoxine, je n'ai pu obtenir une valeur juste qu'en réalisant un étalonnage externe. La 5-

hydroxy-xanthotoxine ne se comporte donc pas comme les autres composés et en particulier comme l'angélicine, qui est le standard interne analytique. La diminution de l'intensité des signaux de ces deux composés en spectrométrie de masse (due à l'encrassement de la source) n'est pas proportionnelle. J'ai donc décidé de doser la 5-hydroxy-xanthotoxine par un étalonnage externe et non pas un étalonnage interne comme pour les autres composés, ce qui est possible du fait de sa bonne linéarité (tableau 16).

Robustesse : La création d'une nouvelle méthode analytique implique sa possible utilisation future par d'autres expérimentateurs. En conséquence, elle se doit d'être robuste, c'est-à-dire de donner les mêmes résultats de quantification pour un même échantillon, même si de légers changements interviennent au niveau du système analytique. Nous avons évalué la robustesse de la méthode en dosant sept coumarines et furocoumarines quantifiables dans des extraits de peau de citron Eurêka, suite à une légère variation du débit d'analyse (0,15 ; 0,20 ; 0,25 mL/min) et de la température de la colonne (35 ; 40 ; 45 °C). Notre méthode est robuste car les résultats de quantification ne sont pas affectés par ces légères variations (c_v généralement inférieurs à 10 %, comme pour la répétabilité) (tableau 2 de la publication n°1).

1.2.2 Paramètres dépendants des échantillons biologiques

Les limites de détection et de quantification des composés et la spécificité de la méthode analytique sont des paramètres qui dépendent de la matrice analysée (ex : peau ou pulpe d'agrume). En conséquence, il faut évaluer ces paramètres sur chaque matrice analysée pour pouvoir valider la méthode de dosage et l'utiliser de façon fiable.

Limites de détection et de quantification : Chaque composé répond différemment à l'ionisation à l'entrée du spectromètre de masse. Il en résulte des signaux d'intensités variables pour des ions différents mais en même quantité dans un échantillon. Il est donc nécessaire de déterminer les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) de chacun des composés pour obtenir une quantification fiable. Un spectre de masse est composé d'un bruit de fond et de signaux (pics). Il est communément admis qu'un composé est détectable lorsque le rapport signal/bruit ou S/N (en terme d'intensité) est supérieur à trois. En dessous de ce seuil, il ne s'agit que de bruit de fond. Un composé devient quantifiable lorsque le rapport signal/bruit dépasse dix. Étant donné que le bruit de fond varie en fonction des matrices, il est nécessaire de vérifier les LOD et LOQ de chacun des composés dans les différentes matrices étudiées. Les valeurs quantifiées par la méthode analytique ne sont fiables que si elles dépassent les LOQ. Nous avons déterminé les LOD et LOQ de chaque composé dans des extraits de peau de citron Eurêka ou d'orange amère (*C. aurantium*). Nous avons supplémenté ces échantillons en coumarines et furocoumarines, dans le cas où le composé est normalement absent dans la matrice testée. Les LOD et LOQ des composés dosés sont généralement très basses (tableau 1 de la publication n°1 et tableau 17), ce qui montre qu'ils répondent bien à l'ionisation et aux conditions d'analyses en général. Les valeurs les plus élevées sont obtenues pour la byakangélicine avec une LOD d'environ 2 mg/kg et une LOQ supérieure à 6 mg/kg (tableau 1 de la publication n°1). Cette molécule

présente une intensité de signal assez faible en comparaison aux autres composés dosés. Cela s'explique entre autres par une ionisation un peu plus difficile pouvant être due à la composition de la phase mobile et/ou au mode d'ionisation choisi (DUIS en mode positif). Cela peut aussi être dû aux températures et aux gaz choisis dans le circuit d'analyse.

	LOD et LOQ (mg/kg poids frais)	
	LOD	LOQ
5-hydroxy-xanthotoxine **(28)**	0,17	0,58

Tableau 17. Limites de détection et de quantification de la 5-hydroxy-xanthotoxine dans la peau d'orange amère.

Spécificité : Il peut parfois arriver que deux composés différents (dont un seul est ciblé par la méthode de dosage) aient la même masse et le même temps de rétention dans la colonne de l'UPLC. Cela engendre alors un effet matrice et la quantification n'est plus fiable. L'évaluation de la spécificité de la méthode analytique permet d'identifier un éventuel effet matrice. Cette démarche est assez laborieuse, car elle consiste à quantifier les molécules dans un échantillon donné et à le supplémenter par la suite avec les molécules dosées à hauteur de 25, 50, 75 et 100 % de la concentration initiale (méthode des ajouts dosés). Si l'aire des pics des composés dosés est proportionnelle aux pourcentages de leur concentration initiale, cela indique qu'il n'y a bien qu'un seul composé dosé et donc pas d'effet matrice. La spécificité ne doit pas nécessairement être évaluée pour chacun des composés. Nous avons donc ciblé les sept composés quantifiables dans notre échantillon de peau de citron Eurêka. La linéarité (r^2 > 0,99) des analyses lors des ajouts dosés montre que ces sept composés sont bien quantifiés indépendamment de toute autre molécule et qu'il n'y a donc pas d'effet matrice dans la peau d'agrumes (tableau 2 de la publication n°1).

Nous avons montré que la méthode analytique en UPLC-MS est valide pour l'identification et la quantification de 28 coumarines et furocoumarines dans la peau d'agrumes. Nous avons pris le parti de considérer que cette méthode est tout aussi bien valide pour les deux tissus qui composent la peau pris séparément, à savoir le flavédo et l'albédo. Elle peut alors être utilisée pour analyser des échantillons de peau, de flavédo ou d'albédo d'agrumes.

Une fois créée, optimisée et validée, nous avons testé notre méthode analytique sur des extraits de peau de six variétés d'agrumes (avec cinq répétitions) de notre consommation : orange douce Washington Navel, citron Eurêka, pomelo Duncan, bergamote Castagnaro, pamplemousse Chandler et clémentine commune (cf. publication n°1, paragraphe 1.4).

1.4 Publication n°1

Référence :

Dugrand, A., Olry, A., Duval, T., Hehn, A., Froelicher, Y. and Bourgaud, F. (2013) Coumarin and furanocoumarin quantitation in citrus peel via ultraperformance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS). *J. Agric. Food Chem.*, 61, 10677-10684.

1.4 Validation de la méthode analytique avec des échantillons de pulpe d'agrumes

1.4.1 Paramètres de validation

Suite à la publication de notre méthode validée pour l'analyse en UPLC-MS de coumarines et furocoumarines dans des échantillons de peau d'agrumes, je me suis lancée dans la validation de celle-ci pour l'étude d'échantillons de pulpe d'agrumes. Comme je l'ai expliqué précédemment, il était seulement nécessaire de déterminer les limites de détection et de quantification des composés et la spécificité de la méthode pour cette matrice.

Limites de détection et de quantification : J'ai déterminé les LOD et LOQ des 28 composés dans la pulpe de lime de Tahiti (*C. latifolia*) ou d'orange amère, de la même manière que je l'avais fait pour les échantillons de peau. Encore une fois, les valeurs obtenues sont assez basses (tableau 18), indiquant une bonne ionisation des composés. La byakangélicine reste la molécule présentant les valeurs les plus élevées avec 1,28 et 4,26 mg/kg de poids frais respectivement (tableau 18). Son analyse est donc plus difficile que pour les autres composés. Il est aussi à noter que les LOD et LOQ des composés sont généralement plus basses dans la pulpe que dans la peau des agrumes (tableaux 17, 18 et tableau 1 de la publication n°1). Nous pouvons faire l'hypothèse que cette dernière matrice provoque plus d'interférences avec les composés dosés. Cela peut être dû à sa composition (à noter qu'il y a plus de coumarines et furocoumarines dans la peau que dans la pulpe des agrumes), mais aussi à la méthode d'extraction (la pulpe étant un milieu plus aqueux, l'extraction est facilitée).

Spécificité : Concernant la spécificité de la méthode pour l'étude d'échantillons de pulpe d'agrumes, les résultats des analyses pour les ajouts dosés sont linéaires ($r^2 > 0,99$) pour les six coumarines et furocoumarines quantifiables dans la pulpe de lime de Tahiti (tableau 18). Ceci montre que ces six composés sont dosés indépendamment de tout autre composé et qu'il n'y a donc pas d'effet matrice dans la pulpe d'agrume.

Les limites de détection et de quantification ayant été déterminées et la spécificité ayant été évaluée, nous pouvons dire que la méthode analytique en UPLC-MS est valide pour l'identification et la quantification de 28 coumarines et furocoumarines dans la pulpe d'agrumes.

Composé	Limite de détection (mg/kg poids frais)	Limite de quantification (mg/kg poids frais)	Spécificité	
			Équation	r^2
Coumarines				
Umbelliférone **(1)**	0,01	0,03	-	-
Citroptène **(5)**	0,01	0,02	-	-
Époxyauraptène **(4)**	0,09	0,30	-	-
Osthol **(2)**	0,00	0,01	-	-
Auraptène **(3)**	0,01	0,03	y = 0,0008 x	0,9969
5-géranyloxy-7-méthoxycoumarine **(6)**	0,00	0,01	-	-
Furocoumarines				
Xanthotoxol **(9)**	0,01	0,04	-	-
Héraclénol **(20)**	0,08	0,28	-	-
5-hydroxy-xanthotoxine **(28)***	0,07	0,25	-	-
Psoralène **(7)**	0,01	0,03	-	-
Bergaptol **(8)**	0,13	0,43	-	-
Xanthotoxine **(11)**	0,01	0,03	-	-
Oxypeucédanine hydrate **(14)**	0,01	0,04	y = 0,0658 x	0,9951
Byakangélicine **(27)**	1,28	4,26	-	-
Isopimpinelline **(22)**	0,02	0,08	y = 0,0168 x	0,9919
Héraclénine **(19)**	0,05	0,15	-	-
Bergaptène **(10)**	0,02	0,06	y = 0,0067 x	0,9990
Byakangélicol **(26)**	0,01	0,02	-	-
Oxypeucédanine **(13)**	0,02	0,05	y = 0,0056 x	0,9989
6',7'-dihydroxybergamottine **(17)**	0,62	2,06	-	-
Impératorine **(18)**	0,05	0,17	-	-
Phelloptérine **(25)**	0,17	0,57	-	-
Cnidiline **(23)**	0,02	0,08	-	-
Époxybergamottine **(16)**	0,04	0,12	-	-
Isoimpératorine **(12)**	0,09	0,29	-	-
Cnidicine **(24)**	0,31	1,03	-	-
8-géranyloxypsoralène **(21)**	0,32	1,07	y = 0,0935 x	0,9959
Bergamottine **(15)**	0,01	0,02	-	-

Tableau 18. Limites de détection et de quantification des coumarines et furocoumarines et spécificité de la méthode UPLC-MS pour l'étude d'extraits de pulpe d'agrumes.

* Les LOD et LOQ de la 5-hydroxy-xanthotoxine ont été déterminées sur des échantillons de pulpe d'orange amère, contrairement aux autres composés où il s'agissait de pulpe de lime de Tahiti. Les correspondances entre composés et numéros de pics sont indiquées dans la figure 1 de la publication n°1.

1.4.2 Identification et quantification de coumarines et furocoumarines dans la pulpe d'agrumes

Suite à cette validation, j'ai testé la méthode analytique sur un échantillon de pulpe de lime de Tahiti. Les résultats obtenus montrent que treize composés y sont détectables dont trois coumarines et dix furocoumarines (tableau 19). Lors de l'analyse des échantillons de peau d'agrumes, nous avions distingué deux groupes d'agrumes : les faibles producteurs (orange, clémentine) et les forts producteurs (citron, bergamote, pamplemousse, pomelo) de coumarines et furocoumarines (tableau 4 de la publication n°1). La composition de la pulpe de la lime de Tahiti semble nous montrer que ce fruit se range dans le groupe des agrumes fortement producteurs de ces composés.

Composé	Lime de Tahiti
Coumarines	
Umbelliférone **(1)**	
Citroptène **(5)**	0,91
Époxyauraptène **(4)**	
Osthol **(2)**	
Auraptène **(3)**	0,19
5-géranyloxy-7-méthoxycoumarine **(6)**	10,14
Furocoumarines	
Xanthotoxol **(9)**	4,72
Héraclénol **(20)**	
Psoralène **(7)**	
Bergaptol **(8)**	24,90
Xanthotoxine **(11)**	
Oxypeucédanine hydrate **(14)**	3,28
Byakangélicine **(27)**	
Isopimpinelline **(22)**	1,33
Héraclénine **(19)**	
Bergaptène **(10)**	0,68
Byakangélicol **(26)**	
Oxypeucédanine **(13)**	0,38
6',7'-dihydroxybergamottine **(17)**	
Impératorine **(18)**	
Phelloptérine **(25)**	
Cnidiline **(23)**	Traces
Époxybergamottine **(16)**	
Isoimpératorine **(12)**	3,38
Cnidicine **(24)**	
8-géranyloxypsoralène **(21)**	11,12
Bergamottine **(15)**	17,57

Tableau 19. Concentration (mg/kg poids frais) des coumarines et furocoumarines dans un extrait de pulpe de lime de Tahiti.

La notion de « traces » signifie que le composé correspondant a pu être détecté mais pas quantifié ($3 < S/N < 10$). Les correspondances entre composés et numéros de pics sont indiquées dans la figure 1 de la publication n°1.

1.5 Discussion et conclusion

Lors de la création de notre méthode, nous avons d'abord optimisé la séparation des 28 coumarines et furocoumarines en UPLC et leur détection dans le spectromètre de masse avec des standards commerciaux. La séparation en UPLC a été créée de façon à ne séparer que les isomères. Nous avons obtenu un gradient d'élution résolutif et court (20 min) en comparaison avec les autres méthodes existantes (ex : 60 min pour séparer quinze furocoumarines, Frérot et Decorzant, 2004 ; 60 min pour séparer 27 composés dont quinze

furocoumarines, Dugo *et al.*, 2009). L'augmentation rapide du pourcentage de solvant B dans la colonne permet de séparer les 28 composés en sept minutes, le temps restant étant consacré au lavage et au rééquilibrage de la colonne. De la même manière, l'utilisation d'une colonne plus courte (10 cm au lieu de 15 cm) permet de réduire le temps de séparation de 0,6 min. L'allongement du temps de lavage de la colonne est fortement utile lors de l'analyse d'extraits végétaux bruts contenant beaucoup de phénylpropanoïdes. Il permet d'éviter les contaminations entre deux échantillons. En plus de la séparation en UPLC, nous avons également optimisé la détection des composés dans le spectromètre de masse, en augmentant la sensibilité (source d'ionisation, voltages à l'entrée de l'appareil) et la sélectivité (mode SIM) de la méthode. Pour augmenter d'avantage la sélectivité d'une méthode, il est possible d'utiliser des fenêtres de temps pour la recherche des m/z. Par exemple, l'umbelliférone (m/z = 163) et le citroptène (m/z = 207) sont élués à 7,01 min et 9,51 min respectivement (tableau 3 de la publication n°1). Or notre méthode ne dose aucun isomère de ces molécules. Nous aurions donc pu paramétrer la recherche des ions ayant un m/z égal à 163 ou 207 entre 6 et 11 minutes par exemple. Pour notre méthode, le mode SIM suffit à avoir une bonne sélectivité pour l'analyse des ions. En revanche, l'utilisation de fenêtres de temps pour la recherche des m/z est très utile lors de l'analyse d'un plus grand nombre de composés. C'est ainsi que nous avons en partie optimisé la détection MS d'une autre méthode que nous avons créée et qui permet le dosage en UPLC-MS de 64 flavonoïdes, coumarines et furocoumarines. Cette nouvelle méthode a fait l'objet d'une publication dans le journal *Annals of Botany* (annexe 6).

Notre méthode analytique a été entièrement validée selon les normes requises, pour l'analyse d'extraits de peau et de pulpe d'agrumes (linéarité, précision, justesse, robustesse, limites de détection et de quantification et spécificité). Son utilisation sur des échantillons de peau d'agrumes nous a permis de constater une cohérence entre nos résultats de dosage et ceux d'autres auteurs (cf. publication n°1, « Identification and quantitation of the coumarins and the furanocoumarins in citrus extracts »). Dans le cadre de la validation de la méthode pour l'analyse d'échantillons de pulpe d'agrumes, nous avons également dosé les coumarines et furocoumarines présentes dans un extrait de pulpe de lime de Tahiti. Certains composés que nous ne trouvions jamais dans la peau des six premiers agrumes testés étaient encore une fois absents dans la pulpe de lime de Tahiti : la xanthotoxine, l'héraclénol, la byakangélicine, l'impératorine et la cnidicine. La xanthotoxine et l'héraclénol sont des furocoumarines substituées en position 8. Elles semblent être plus rares chez les agrumes que celles substituées en position 5 telles que le bergaptol et ses dérivés (bergaptène, bergamottine, époxybergamottine, 6',7'-dihydroxybergamottine) dont certains sont quantifiés ici (Dugo *et al.*, 2000 ; Frérot et Decorzant, 2004 ; Vandermolen *et al.*, 2013). La byakangélicine, l'impératorine et la cnidicine ont déjà été quantifiées dans des échantillons de jus de lime, mais ce ne sont pas les composés majoritaires (Costa *et al.*, 2014). Le fait que l'on ne les retrouve pas dans cet échantillon de pulpe de lime de Tahiti peut s'expliquer de différentes manières. Il est possible que les limites de détection de ces composés soient trop élevées (ce qui peut notamment être le cas pour la byakangélicine et la cnidicine, cf. tableau 18). Ces furocoumarines peuvent aussi être tout simplement absentes dans cette variété où au moment de la récolte du fruit du fait des conditions de culture. Concernant les composés que j'ai identifiés dans la pulpe de lime de Tahiti, certains avaient déjà été quantifiés dans des extraits de jus de lime : l'oxypeucédanine hydrate, l'isoimpératorine, la cnidiline, le 8-

géranyloxypsoralène, la 5-géranyloxy-7-méthoxycoumarine (Costa *et al.*, 2014), le citroptène, l'isopimpinelline, le bergaptène et la bergamottine (Gorgus *et al.*, 2010 ; Costa *et al.*, 2014). En revanche, j'ai aussi pu identifier de l'auraptène dans la pulpe de lime de Tahiti, alors qu'une autre équipe de recherche n'en avait pas détecté dans le même tissu de cette variété (Ogawa *et al.*, 2000). D'autres composés sont également présents (xanthotoxol, bergaptol et oxypeucédanine), mais à ma connaissance, aucune étude ne s'est portée sur leur identification dans des échantillons de pulpe de lime. Dans l'ensemble, les résultats d'identification et de quantification des coumarines et furocoumarines dans la pulpe de lime de Tahiti sont donc concordants avec ceux des autres auteurs.

Nous avons créé, optimisé et validé une méthode d'analyse en UPLC-MS de 28 coumarines et furocoumarines dans des extraits de peau (flavédo et albédo pouvant être analysés séparément) et de pulpe d'agrumes. Cette méthode est rapide, sensible et fiable. À l'origine, elle permettait de doser un vingt-neuvième composé qui est la 8-géranylumbelliférone (m/z = 299). Ce composé n'étant pas commercialisé, nous avons dû abandonner sa quantification lorsque son standard était épuisé, puisque nous ne pouvions plus préparer de gamme étalon. Cependant, nous avons tout de même pu doser la 8-géranylumbelliférone dans la peau de 56 variétés d'agrumes, ce qui a été valorisé dans un autre article publié dans le journal *Plant Physiology* (annexe 7).

À l'avenir, notre méthode pourra être utilisée pour évaluer la phototoxicité de différents agrumes, mais également leur possible implication dans l'effet pomelo. Aujourd'hui, il a largement été démontré que le pomelo interagissait avec les médicaments. En revanche, très peu d'études se sont focalisées sur la possible intervention d'autres agrumes dans ce phénomène. Pourtant, les oranges douces et amères, les clémentines, les citrons et les limes sont également utilisés dans notre consommation. L'utilisation de notre méthode pourra aussi permettre de distinguer les variétés d'agrumes produisant des coumarines et furocoumarines aux propriétés anti-cancéreuses par exemple. Dans la suite de mon manuscrit, je décris l'utilisation que nous avons faite de notre méthode analytique. Il s'agit du chémotypage d'un large panel de variétés d'agrumes, dans le but de confirmer l'existence de deux groupes : les faibles et forts producteurs de coumarines et furocoumarines.

Partie II :

Chémotypage de 62 variétés d'agrumes du genre *Citrus* pour l'identification d'espèces faiblement et fortement productrices de coumarines et furocoumarines

Publication n°2 :

Dugrand-Judek, A., Olry, A., Hehn, A., Costantino, G., Ollitrault, P., Froelicher, Y. and Bourgaud, F. The distribution of coumarins and furanocoumarins in *Citrus* species closely matches *Citrus* phylogeny and reflects the organization of biosynthetic pathways. En cours d'évaluation pour *PLoS One*.

La deuxième partie de mon travail traite de l'utilisation de la méthode d'analyse en UPLC-MS de 27 coumarines et furocoumarines (5-hydroxy-xanthotoxine non incluse) dans des extraits de peau et de pulpe de 62 variétés d'agrumes du genre *Citrus*. Ce travail a été valorisé par une publication en cours d'évaluation, après correction, pour le journal *PLoS One* et présentée ici. Dans cette deuxième partie, la contribution des différents auteurs aux travaux réalisés est la suivante :

- Validation de la méthode UPLC-MS pour l'analyse de 27 coumarines et furocoumarines dans des échantillons de pulpe d'agrumes (présentée dans l'article) : Audray Dugrand-Judek ;
- Injection des échantillons d'agrumes à l'UPLC-MS et retraitement des données : Audray Dugrand-Judek ;
- Analyses statistiques des données : Audray Dugrand-Judek, Gilles Costantino, Patrick Ollitrault et Yann Froelicher ;
- Analyse des résultats qualitatifs et quantitatifs : Audray Dugrand-Judek, Patrick Ollitrault, Yann Froelicher et Frédéric Bourgaud ;
- Analyse des résultats sur le tangelo : Audray Dugrand-Judek ;
- Rédaction de l'article publié : Audray Dugrand-Judek, Alexandre Olry, Alain Hehn, Gilles Costantino, Patrick Ollitrault, Yann Froelicher et Frédéric Bourgaud.

2. Partie II : Chémotypage de 62 variétés d'agrumes du genre *Citrus* pour l'identification d'espèces faiblement et fortement productrices de coumarines et furocoumarines

Après avoir mis au point une méthode analytique performante pour identifier et quantifier des coumarines et furocoumarines dans des extraits de peau et de pulpe d'agrumes, nous nous sommes attelés au chémotypage d'un large panel de variétés d'agrumes. L'objectif était de pouvoir distinguer des espèces faiblement et fortement productrices de composés.

Dans cette deuxième partie, je présente le matériel végétal utilisé pour réaliser le chémotypage initial de 61 variétés d'agrumes. Je reprends ensuite les résultats clés s'inscrivant dans mon travail de doctorat, à savoir les données quantitatives et qualitatives obtenues lors de l'analyse UPLC-MS des échantillons de peau et de pulpe d'agrumes. En parallèle, je présente l'article que nous avons écrit sur ces travaux (paragraphe 2.2) et qui est actuellement en cours d'évaluation, après correction, pour le journal *PLoS One*. La richesse des résultats obtenus nous a permis d'aller plus loin que l'objectif initial que nous nous étions fixé. En effet, nous avons pu nous pencher sur la structuration de la diversité génétique des agrumes, qui reste encore très confuse aujourd'hui. Nous avons également formulé de nouvelles hypothèses quant à l'organisation de la production de coumarines et furocoumarines chez les agrumes (voies de biosynthèses, schémas de sélection variétale). À la fin de cette partie, je présente donc les résultats de chémotypage d'une soixante-deuxième variété d'agrume (tangelo), allant dans le sens des hypothèses formulées dans l'article.

2.1 Chémotypage initial de 61 variétés d'agrumes du genre *Citrus*

2.1.1 Description du matériel végétal utilisé

Pour pouvoir identifier des plantes intéressantes en termes de production de coumarines et furocoumarines (*i.e.* grandes quantités et diversité ou au contraire faibles quantités et diversité), nous avons réalisé une analyse approfondie de 61 variétés d'agrumes. Nous les avons choisies de façon à ce qu'elles soient représentatives de leur diversité génétique, à savoir : les quatre taxons ancestraux (7 pamplemousses, 11 mandarines dont 8 douces et 3 acides, 3 cédrats et 3 papedas) et certaines espèces secondaires (4 oranges amères, 3 pomelos, 4 oranges douces, 4 hybrides de mandarines, 7 citrons, 10 limes, 1 bergamote et 4 autres hybrides : Mountain, Yuzu, Khasi et Nasnaran). Elles sont répertoriées dans le tableau S1 de la publication n°2. Toutes ces variétés font exclusivement partie du genre *Citrus*. Nous nous sommes focalisés sur ce genre car il comprend le plus grand nombre d'espèces mais est aussi le plus cultivé dans le monde, que ce soit pour l'alimentation ou la préparation de produits cosmétiques. Le matériel que nous avons utilisé a été prélevé sur deux sites différents. La première campagne de récolte a été effectuée sur le site de la Station de Recherche INRA/CIRAD de San Giuliano en Corse. Le second lieu de récolte est la pépinière Bachès à Eus, dans le sud de la France, d'où provient uniquement le papeda Micrantha. Nous avons récolté les fruits et effectué les prélèvements de peau et de pulpe selon les conditions décrites dans la section « Matériel et méthodes ».

2.1.2 Distribution générale des coumarines et furocoumarines chez les agrumes

Pour réaliser le chémotypage des différentes variétés d'agrumes ciblées, nous nous sommes focalisés sur les 6 coumarines et les 21 furocoumarines initialement dosables par notre méthode en UPLC-MS. Pour quasiment tous les composés, nous disposions des standards commerciaux nous permettant de réaliser les gammes étalon et donc la quantification. En revanche, nous n'avions pas assez de standard pour la 5-géranyloxy-7-méthoxycoumarine, ce qui nous a obligé à n'en faire que l'identification (et non la quantification) dans les échantillons d'agrumes. Les 27 composés peuvent être classés en quatre groupes : les coumarines et les furocoumarines du groupe du bergaptène (5-méthoxypsoralène), de la xanthotoxine (8-méthoxypsoralène) ou de l'isopimpinelline (5,8-diméthoxypsoralène). Leur structure est détaillée dans la figure 1 de la publication n°2.

2.1.2.1 Comparaison des tissus du fruit

La plupart des variétés d'agrumes présentent de plus grandes quantités de coumarines et furocoumarines dans la peau que dans la pulpe (figures 2 et 3 de la publication n°2 respectivement). Les différences sont parfois très importantes comme par exemple avec les cédrats (cédrat Etrog : facteur 100 entre la peau et la pulpe, figures 30-C et 31-C, 2ème barre de l'histogramme) et certains de leurs descendants (citron Eurêka : facteur 300 entre la peau et la pulpe et presque autant pour la limonette de Marrakech, figure 30-C 4ème et 8ème barres de l'histogramme respectivement et figure 31-C 3ème et 7ème barres de l'histogramme respectivement). De façon plus rare, certaines variétés d'agrumes produisent quasiment autant de coumarines et furocoumarines dans la peau et dans la pulpe, voire plus dans la pulpe. C'est le cas des pamplemousses Deep Red et Pink et des quatre oranges amères analysées qui ont une pulpe très riche, notamment en furocoumarines substituées en position 5 (tableaux A et G des tableaux S3 de la publication n°2).

Les coumarines et furocoumarines produites par les agrumes sont également beaucoup plus variées dans la peau (649 occurrences dans la figure 4 de la publication n°2) que dans la pulpe (561 occurrences dans la figure 5 de la publication n°2). Dans le cas de la limonette de Marrakech, cette différence est la plus importante avec l'identification de treize composés dans la peau et seulement une dans la pulpe (oxypeucédanine) (tableau I des tableaux S3 de la publication n°2). Par ailleurs, les composés les plus représentés dans la peau et dans la pulpe des variétés d'agrumes sont les furocoumarines du groupe du bergaptène (figures 2 et 3 de la publication n°2). Cependant, il nous faut tenir compte du nombre de molécules quantifiées, à savoir : 5 coumarines, 8 furocoumarines substituées en position 5, 6 furocoumarines substituées en position 8 et 6 furocoumarines substituées en positions 5 et 8 (figure 1 de la publication n°2).

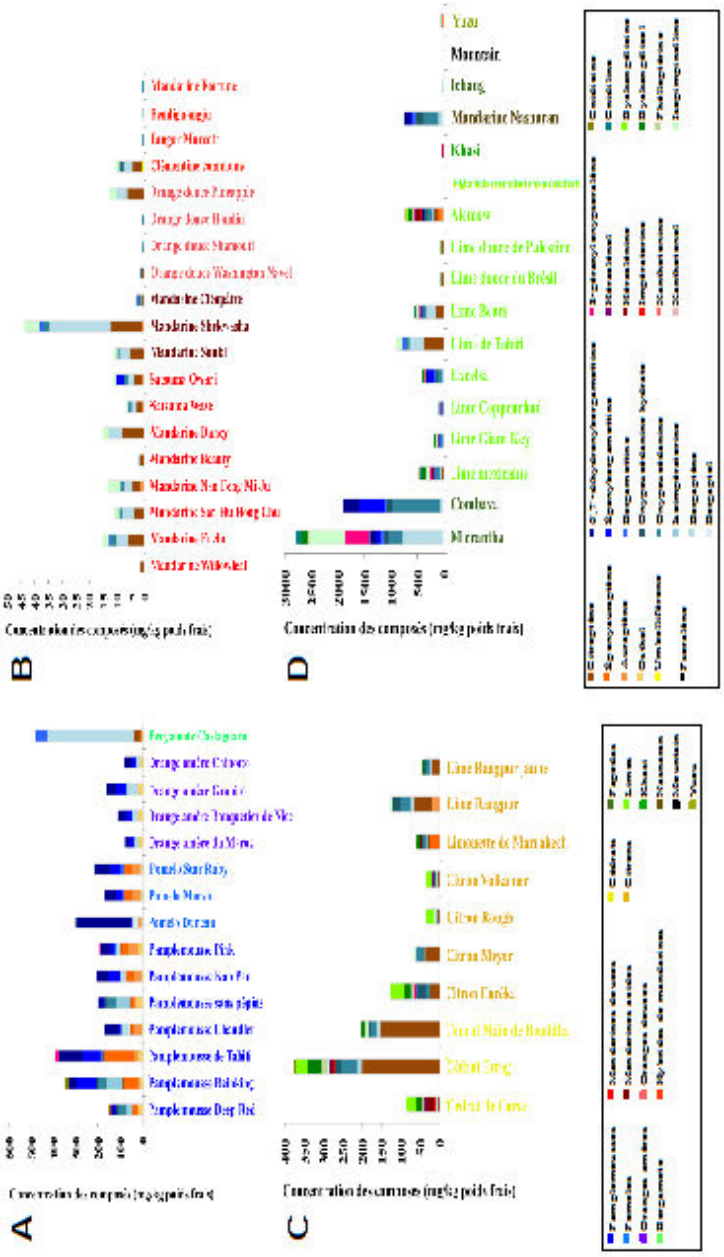


Figure 30. Concentration (mg/kg poids frais) des coumarines et furocoumarines dans les extraits de peau des 61 variétés d'agrumes initialement étudiées.

Les histogrammes sont présentés de façon à regrouper les agrumes par espèces et au plus proche de leur parent le plus semblable. (A) Pamplemousses, pomelos, oranges amères et bergamote ; (B) Mandarines douces et acides, oranges douces et hybrides de mandarines ; (C) Cédrats et citrons ; (D) Papedas, limes et autres hybrides.

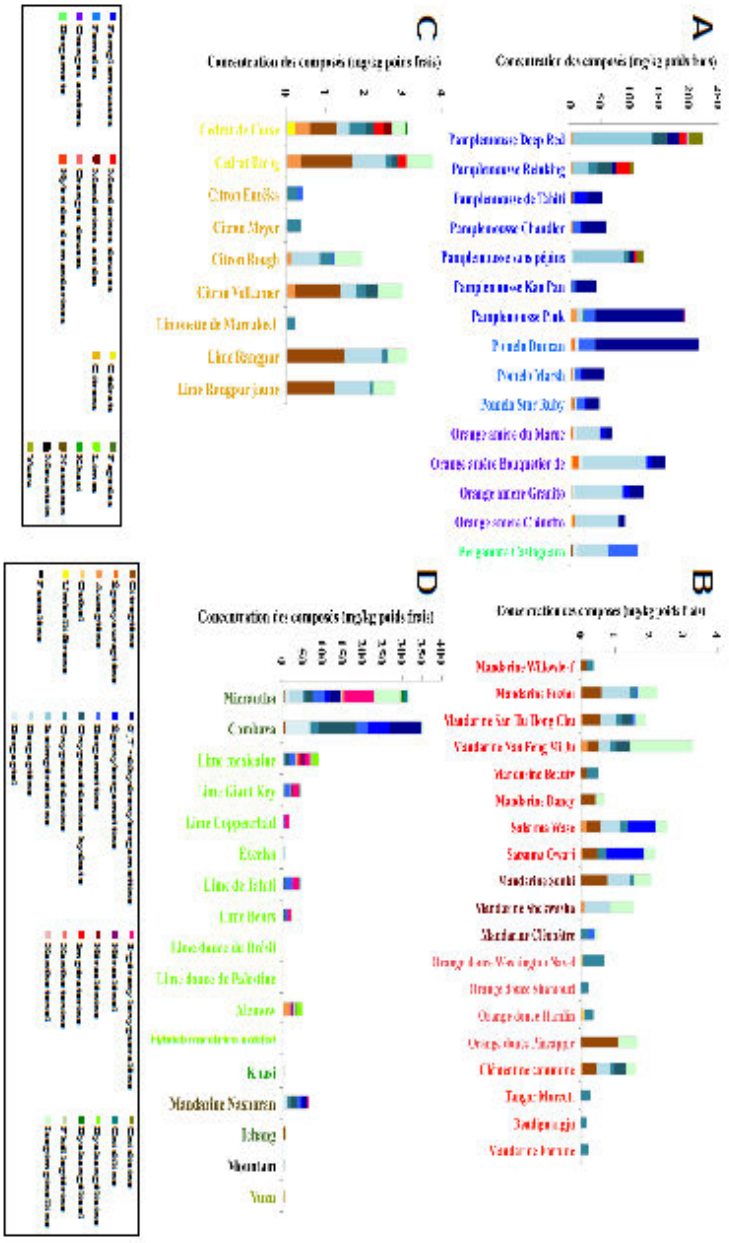


Figure 31. Concentration (mg/kg poids frais) des coumarines et furocoumarines dans les extraits de pulpe des 61 variétés d'agrumes initialement étudiées.

Les histogrammes sont présentés de façon à regrouper les agrumes par espèces et au plus proche de leur parent le plus semblable. (A) Pamplemousses, pomelos, oranges amères et bergamote ; (B) Mandarines douces et acides, oranges douces et hybrides de mandarines ; (C) Cédrats et citrons ; (D) Papedas, limes et autres hybrides.

La peau des agrumes est donc le tissu contenant les plus grandes quantités de coumarines et furocoumarines en comparaison avec la pulpe. Ces composés y sont également plus diversifiés.

2.1.2.2 Comparaison des variétés d'agrumes

Les teneurs en coumarines et furocoumarines varient grandement d'une variété d'agrume à l'autre (figures 30 et 31 et tableaux S3 de la publication n°2). Nous pouvons distinguer trois grandes familles de variétés en fonction de leur production en coumarines et furocoumarines : les agrumes fortement producteurs (plus de 100 mg/kg de poids frais), les producteurs intermédiaires (entre 10 et 100 mg/kg de poids frais) et les faibles producteurs (moins de 10 mg/kg de poids frais). Notre étude fait ressortir deux variétés d'agrumes très fortement productrices : Micrantha et Combava. Les teneurs en coumarines et furocoumarines dans la peau / pulpe de ces deux papedas sont 2 777,8 / 315,4 mg/kg de poids frais (FW) et 1 908,7 / 352,1 mg/kg FW respectivement (tableau C des tableaux S3 de la publication n°2). Le troisième papeda de l'étude (Ichang) est au contraire un assez faible producteur de coumarines et furocoumarines (peau : 25,3 mg/kg FW ; pulpe : 8,4 mg/kg FW) (tableau C des tableaux S3 de la publication n°2). D'autres variétés produisent aussi de grandes quantités de ces composés telles que certains cédrats (Etrog et Main de Bouddha), certaines limes issues de croisements impliquant cédratier et papeda (Mexicaine, Giant Key, Excelsa, Tahiti, Bears, Alemow), certains pamplemousses et leurs descendants (oranges amères, pomelo, bergamote) et la mandarine Nasnaran (peau : 757,20 mg/kg FW ; pulpe : 65,16 mg/kg FW) (tableaux A, B, E, G, J, K et L des tableaux S3 de la publication n°2).

D'autres variétés d'agrumes produisent des quantités intermédiaires de coumarines et furocoumarines comme par exemple le cédrat de Corse (peau : 82,39 mg/kg FW ; pulpe : 3,10 mg/kg FW), certains citrons issus de croisements entre cédratier et mandarinier, certaines limes (Coppenrhad, Brésil, Palestine) et les hybrides Yuzu et Khasi (tableaux B, I, J et L des tableaux S3 de la publication n°2).

La plupart des espèces faiblement productrices sont des variétés de mandarines (ex : mandarine Willowleaf ; peau : 1,54 mg/kg FW ; pulpe : 0,47 mg/kg FW) ou certains de leurs descendants (oranges douces, hybrides de mandarines) (tableaux D, F et H des tableaux S3 de la publication n°2).

Les teneurs en coumarines et furocoumarines varient fortement d'un agrume à l'autre. Par exemple, il existe une différence d'un facteur supérieur à 5000 pour la peau et 1000 pour la pulpe entre le papeda Micrantha et l'hybride de mandarine Bendiguangju.

2.1.3 Organisation de la diversité génétique des agrumes en fonction de la composition en coumarines et furocoumarines

Nous avons réalisé plusieurs ACP sur les résultats de quantification des coumarines et furocoumarines dans la peau des variétés d'agrumes. Les résultats obtenus ne nous ont pas permis d'obtenir une représentation satisfaisante de la structuration de la diversité génétique des 61 variétés d'agrumes. En effet, les variétés peu productrices de coumarines et furocoumarines sont « écrasées » par les quelques variétés fortement productrices (ex : Micrantha, Combava) (figure S1 de la publication n°2). Nous avons obtenu une meilleure représentation en écartant ces variétés fortement productrices (figure 7 de la publication n°2), mais elle ne nous permet pas d'avoir une vision globale de la production de coumarines et furocoumarines chez les agrumes. Concernant les données quantitatives obtenues sur la pulpe des agrumes, la construction préalable d'un arbre phylogénétique nous a montré que les valeurs des bootstraps étaient assez faibles, notamment celle de la ramification principale (figure S2 de la publication n°2). De plus, la différenciation des quatre taxons est incomplète. Les groupes formés ne sont donc pas stables et il est inutile de se lancer dans la réalisation d'ACP.

Pour résoudre ces problèmes de représentation des données, nous avons adopté une nouvelle stratégie, consistant à faire abstraction de l'aspect quantitatif des résultats d'analyses en UPLC-MS. J'ai donc réalisé des ACP en attribuant la valeur 1 aux composés détectables ou quantifiables et la valeur 0 aux composés absents chez une variété d'agrume. L'avantage de telles analyses, est qu'il est possible d'obtenir des représentations exploitables de toutes les données sur un même graphique, grâce à une meilleure répartition des observations (variétés d'agrumes). Dans notre cas, ces ACP sont très utiles pour étudier la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes. En effet, elles reflètent la capacité d'une variété à produire un composé particulier dans la peau ou la pulpe de ses fruits. Pour les variétés d'agrumes hybrides, cette capacité peut en plus être mise en relation avec celle de ses ascendants (constitution phylogénétique des variétés décrite dans les figures 2 et 3 de la publication n°2). Par contre, il n'est pas possible d'effectuer des études de dominance lorsque l'on s'affranchit des données quantitatives. En d'autres termes, on ne peut pas savoir de quel ascendant l'hybride est le plus proche, quant à sa capacité de produire une quantité donnée de coumarines et furocoumarines. Nous avons donc utilisé une autre méthode pour effectuer ces études de dominance (cf. paragraphe 2.3).

2.1.3.1 Dans la peau

L'ACP réalisée avec les données d'absence/présence des coumarines et furocoumarines dans la peau des agrumes, indique que les variétés peuvent être réparties en quatre groupes distincts (figure 32). Les deux axes de cette ACP expliquent 41,49 % de la variance et la plupart des variables sont liées au premier axe (26,51 %).

Le premier groupe comprend les pamplemousses et certains de leurs descendants (oranges amères, pomelos et bergamote), le papeda Combava et les hybrides Nasnaran et Yuzu (figure 32-A). Leur position sur l'ACP (en haut) est principalement liée à la présence de

composés géranylés tels que l'époxyauraptène et les furocoumarines substituées en position 5 (bergamottine, époxybergamottine, 6',7'-dihydroxybergamottine) (figure 32-B). Ces variétés produisent aussi une coumarine assez peu fréquente chez les agrumes : l'osthol, qui est le seul composé *C*-prénylé de l'étude.

Le deuxième groupe rassemble le papeda Micrantha et la plupart des limes qui descendent de cette espèce (Excelsa, Alemow, Mexicain, Giant Key, Coppenrhad, Tahiti, Bears), le citron Eurêka et l'hybride Khasi (figure 32-A). Ces variétés se caractérisent par la production d'une très grande diversité de coumarines et de furocoumarines hydroxylées, méthylées, prénylées ou géranylées en position 5, 8 ou 5 et 8 (figure 32-B).

Le troisième groupe comprend les cédrats et certains de leurs descendants tels que les limes Brésil et Palestine, l'hybride mandarine × cédrat et les citrons Marrakech, Rangpur et Volkamer (figure 32-A). Ces variétés produisent des coumarines et furocoumarines méthoxylées (citroptène, bergaptène, isopimpinelline) et des furocoumarines prénylées en position 5 (oxypeucédanine hydrate), 8 (héraclénol, héraclénine) ou 5 et 8 (cnidiline, phelloptérine, byakangélicol, byakangélicine) (figure 32-B).

Le quatrième groupe rassemble les variétés d'agrumes très faiblement productrices de coumarines et furocoumarines (figure 32-B) telles que les mandarines et leurs descendants (oranges douces, hybrides de mandarines, citrons Meyer et Rough), le papeda Ichang et l'hybride Mountain (figure 32-A). Ces variétés produisent néanmoins quelques composés appartement principalement au groupe du bergaptène, comme par exemple l'oxypeucédanine qui est identifiable chez tous les agrumes et qui ne joue donc aucun rôle dans leur position sur l'ACP (figure 32-B).

2.1.3.2 Dans la pulpe

Une seconde ACP réalisée sur les coumarines et furocoumarines dosées dans la pulpe des agrumes, permet cette fois de distinguer trois groupes (figure 33). Les deux axes de cette ACP expliquent 45,26 % de la variance et la plupart des variables sont encore liées au premier axe (28,86 %).

Le premier groupe comprend les pamplemousses et certains de leurs descendants (oranges amères, pomelos et bergamote), le Combava, le citron Eurêka et la mandarine Nasnaran (figure 33-A). Ces variétés se distinguent généralement des autres par la production de composés géranylés (époxyauraptène et furocoumarines du groupe du bergaptène), d'osthol, de composés à structure « basique » (psoralène, bergaptol) et d'isoimpératorine, une furocoumarine prénylée en position 5 (figure 33-B).

Le deuxième groupe rassemble le papeda Micrantha, la plupart des limes qui descendent de cette espèce (Mexican, Giant Key, Alemow, Coppenrhad, Excelsa, Bears, Tahiti) et l'hybride Khasi (figure 33-A). Ces variétés se caractérisent par la production d'une grande diversité de coumarines et de furocoumarines, en particulier les formes prénylées des groupes du bergaptène, de la xanthotoxine et de l'isopimpinelline et le xanthotoxol et son dérivé méthylé la xanthotoxine (figure 33-B).

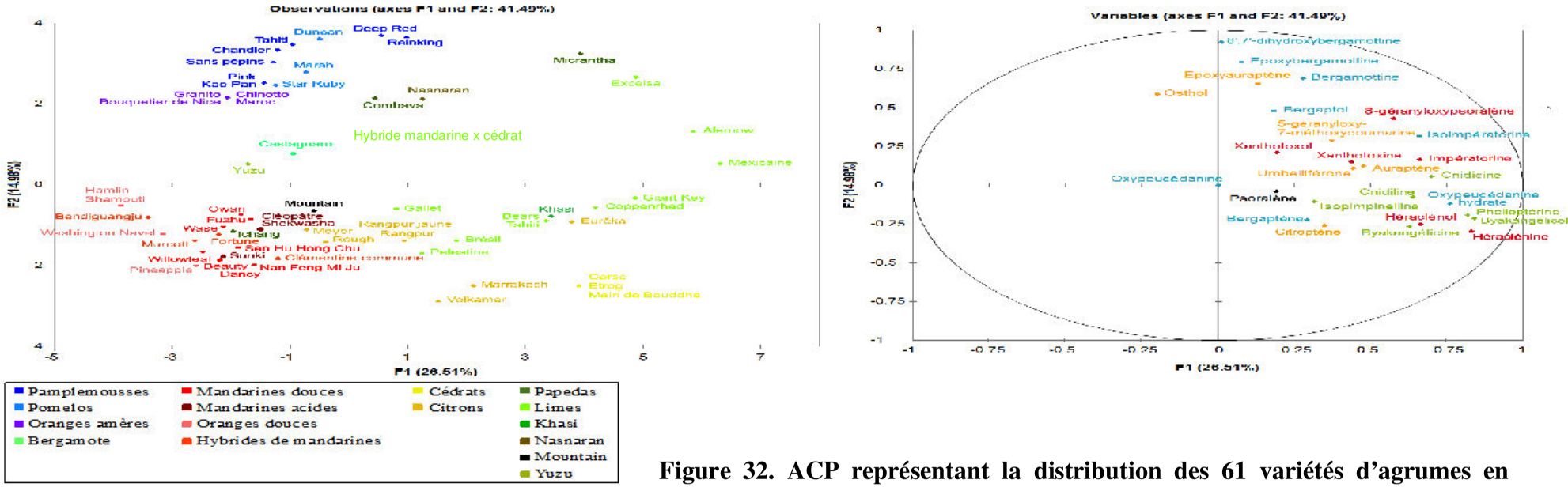


Figure 32. ACP représentant la distribution des 61 variétés d'agrumes en fonction de la présence/absence de 27 coumarines et furocoumarines dans leur peau.

(A) Distribution des observations (variétés d'agrumes) ; (B) Distribution des variables (coumarines et furocoumarines). Les coumarines sont indiquées en orange, les furocoumarines du groupe du bergaptène en bleu, les furocoumarines du groupe de la xanthotoxine en rouge et les furocoumarines du groupe de l'isopimpinelline en vert.

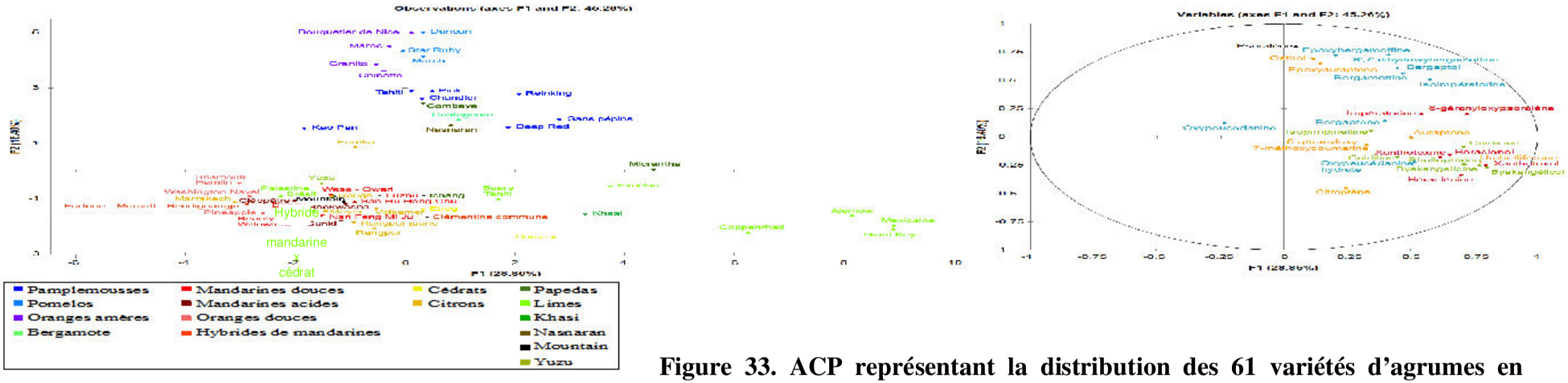


Figure 33. ACP représentant la distribution des 61 variétés d'agrumes en fonction de la présence/absence de 27 coumarines et furocoumarines dans leur pulpe.

(A) Distribution des observations (variétés d'agrumes) ; (B) Distribution des variables (coumarines et furocoumarines). Les coumarines sont indiquées en orange, les furocoumarines du groupe du bergaptène en bleu, les furocoumarines du groupe de la xanthotoxine en rouge et les furocoumarines du groupe de l'isopimpinelline en vert.

Le troisième groupe comprend les variétés d'agrumes présentant une très faible diversité de coumarines et furocoumarines dans la pulpe (figure 33-B). Il s'agit des mandarines et de certains de leurs descendants (oranges douces, hybrides de mandarines, hybride mandarine × cédrat), des cédrats (le cédrat Main de Bouddha n'est pas inclus ici, car les fruits ne contenaient pas de pulpe pour les analyses), de certaines espèces secondaires dérivant des cédrats (tous les citrons sauf Eurêka et les limes douces de Palestine et du Brésil), du papeda Ichang et des hybrides Mountain et Yuzu (figure 33-A).

En se basant sur les données qualitatives obtenues pour la peau des agrumes (tissu présentant la plus grande diversité de coumarines et furocoumarines produites), les variétés peuvent être réparties en quatre groupes distincts :

1. Les pamplemousses et leurs descendants les plus proches (oranges amères, pomelos, bergamote) qui se distinguent par la production de composés géranylés (époxyauraptène et furocoumarines du groupe du bergaptène) et d'osthol ;
2. Le papeda Micrantha et ses descendants (limes) qui produisent toutes sortes de coumarines et furocoumarines ;
3. Les cédrats et leurs hybrides (limes et citrons) qui se caractérisent principalement par la production de furocoumarines prénylées en position 5, 8 ou 5 et 8 ;
4. Les mandarines et leurs hybrides les plus proches (oranges douces et hybrides de mandarines) qui ne produisent que de très faibles quantités de coumarines et furocoumarines.

À la suite de ce premier travail d'identification et de quantification de coumarines et furocoumarines chez ces 61 variétés d'agrumes, nous avons pu mettre en relation la diversité chimique obtenue avec la phylogénie des *Citrus* (cf. publication n°2, paragraphe 2.2, « Coumarin and furanocoumarin chemical diversity in relation to the recent advances in *Citrus* phylogeny »).

2.2 Publication n°2

Référence :

Dugrand-Judek, A., Olry, A., Hehn, A., Costantino, G., Ollitrault, P., Froelicher, Y. and Bourgaud, F. The distribution of coumarins and furanocoumarins in *Citrus* species closely matches *Citrus* phylogeny and reflects the organization of biosynthetic pathways. En cours d'évaluation pour *PLoS One*.

The Distribution of Coumarins and Furanocoumarins in *Citrus* Species Closely Matches *Citrus* Phylogeny and Reflects the Organization of Biosynthetic Pathways

Audray Dugrand-Judek[1, 2], Alexandre Olry[1, 2], Alain Hehn[1, 2], Gilles Costantino[3], Patrick Ollitrault[4, 5], Yann Froelicher*[, 6] and Frédéric Bourgaud*[, 1, 2]

[1] Université de Lorraine, UMR 1121 Laboratoire Agronomie et Environnement Nancy-Colmar, 2 avenue de la forêt de Haye, TSA 40602, 54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France
[2] INRA, UMR 1121 Université de Lorraine, UMR 1121 Laboratoire Agronomie et Environnement Nancy-Colmar, 2 avenue de la forêt de Haye, TSA 40602, 54518 Vandœuvre-lès-Nancy, France
[3] INRA, UMR AGAP, Station INRA, F-20230 San Giuliano, France
[4] Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (Ivia), 46113 Moncada, Valencia, Spain
[5] CIRAD, UMR AGAP, Station de Roujol, 97170 Petit-Bourg, Guadeloupe, France
[6] CIRAD, UMR AGAP, Station INRA, F-20230 San Giuliano, France

*Corresponding authors:
E-mail: frederic.bourgaud@univ-lorraine.fr (FB)
E-mail: froelicher@cirad.fr (YF)

Abstract

Citrus plants are able to produce defense compounds such as coumarins and furanocoumarins to cope with herbivorous insects and pathogens. In humans, these chemical compounds are strong photosensitizers and can interact with medications, leading to the "grapefruit juice effect". Removing coumarins and furanocoumarins from food and cosmetics imply additional costs and might alter product quality. Thus, the selection of *Citrus* cultivars displaying low coumarin and furanocoumarin contents constitutes a valuable alternative. In this study, we performed ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry analyses to determine the contents of these compounds within the peel and the pulp of 61 *Citrus* species representative of the genetic diversity all *Citrus*. Generally, *Citrus* peel contains larger diversity and higher concentrations of coumarin/furanocoumarin than the pulp of the same fruits. According to the chemotypes found in the peel, *Citrus* species can be separated into 4 groups that correspond to the 4 ancestral taxa (pummelos, mandarins, citrons and papedas) and extended with their respective secondary species descendants. Three of the 4 ancestral taxa (pummelos, citrons and papedas) synthesize high amounts of these compounds, whereas mandarins appear practically devoid of them. Additionally, all ancestral taxa and their hybrids are logically organized according to the coumarin and furanocoumarin pathways described in the

!

literature. This organization allows hypotheses to be drawn regarding the biosynthetic origin of compounds for which the biogenesis remains unresolved. Determining coumarin and furanocoumarin contents is also helpful for hypothesizing the origin of *Citrus* species for which the phylogeny is presently not firmly established. Finally, this work also notes favorable hybridization schemes that will lead to low coumarin and furanocoumarin contents, and we propose to select mandarins and Ichang papeda as *Citrus* varieties for use in creating species devoid of these toxic compounds in future breeding programs.

Introduction

Citrus originate from the tropical and subtropical regions of Southeast Asia and their culture was initiated in India and China during the first millenary BC (1). Currently, citrus are cultivated between the latitudes 40°N and 40°S in tropical and subtropical regions (2). In 2013, citrus crops represented the most important fruit produced in the world, with more than 135 million tons (3). Citrus belong to the Rutaceae family, which is composed of approximately 160 genera and 1900 species (4); true citrus belong to the Aurantioideae subfamily, the Citreae tribe and the Citrineae subtribe. True citrus include 6 genera: *Citrus*, *Fortunella*, *Poncirus*, *Microcitrus*, *Eremocitrus* and *Clymenia* (5). Citrus taxonomy remains controversial due to a long cultivation history, complex reproductive biology and somatic bud mutation. Swingle and Reece (1967) (5) and Tanaka (1977) (6), which recognize 16 and 162 species, respectively, remain the two major classification systems currently used. However, this last decade, molecular analyses have provided decisive information regarding *Citrus* domestication and the relations between various cultivated species of *Citrus* (7–14). Four ancestral taxa, *Citrus medica* L. (citron), *Citrus reticulata* Blanco (mandarin), *Citrus maxima* (Burm.) Merr. (pummelo), and *Citrus micrantha* Wester (papeda), have been identified as the ancestors of all cultivated Citrus (8,10,12,14). Among the four basic horticultural groups, no evidence of interspecific introgression was found in pummelos, citrons, and *C. micrantha*. In contrast, evidence of introgression by *C. maxima* was found in sweet mandarin by sequencing and resequencing (13,14). However, 'Cleopatra', 'Sunki' and 'Shekwasha' mandarin, which share the acidic mandarin cytoplasm defined by Froelicher *et al.* (2011) (10) from mitochondrial data and confirmed by Carbonell-Caballero *et al.* (2015) (15) with chloroplast data, present no evidence of introgression (14). The secondary species *Citrus sinensis* (L.) Osb. (sweet orange), *Citrus aurantium* L. (sour orange), *Citrus paradisi* Macf. (grapefruit), *Citrus limon* (L.) Burm. (lemon), and *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. (lime) arose from the hybridization of the 4 ancestral taxa (8,10,12,14). In fact, *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. paradisi*, and tangors had a 2 ancestral taxa admixture structure (*C. reticulata* and *C. maxima*) with variable contributions. The origins of *C. limon* and *C. aurantifolia* (Swingle and Reece taxonomy) are more complex and come from 2 or 3 taxa hybridization. Similarly, *C. aurantifolia* originates from different taxa hybridization (2 to

!

4 taxa) composed systematically of citron and papeda taxa. *Citrus amblycarpa* secondary species displayed approximately 50% contributions from *C. reticulata* and *C. micrantha* (14).

Coumarins (benzo-α-pyrones) constitute a class of secondary metabolites commonly found in higher plants (16). In a limited number of plant families, such as Rutaceae, Moraceae, Apiaceae and Fabaceae, umbelliferone (7-hydroxycoumarin), a ubiquitous coumarin of higher plants, can undergo subsequent biochemical modifications corresponding to a prenylation step at C6 or C8 followed by the closure of a furan ring. These modifications generate furanocoumarins, a new subclass of compounds involved in plant defense against pathogens (16) and, more generally, in plant environmental adaptation (16,17). Citrus, as members of the Rutaceae, can synthesize both coumarins and furanocoumarins and are rich in dimethylallylated and/or geranylated compounds (see Fig. 1) such as bergamottin (5-geranyloxypsoralen), aurapten (7-geranyloxycoumarin) or imperatorin (8-dimethylallyloxypsoralen).

In parallel to their ecological functions in plants, coumarins and furanocoumarins can be deleterious for humans. These compounds are potential photosensitizers that can cause severe phytophotodermatitis after either skin contact (18) or ingestion (19) followed by sun UV exposure. This photosensitization property is a notable problem with citrus essential oils such as bergamot oil because they are extensively used in perfumes and cosmetics. In addition, furanocoumarin monomers (20) and dimers such as paradisins (21) are known to inhibit cytochrome P450 (CYP) from different families (22,23). Notably, interactions between furanocoumarins and human CYP3A4, a CYP found in intestinal enterocytes and in liver hepatocytes, have generated many concerns because this P450 (i) represents half of all human P450 enzyme pools and (ii) plays a major role in the metabolism of drugs altered by oxidation (24). CYP3A4 furanocoumarin-mediated inhibition increases the bioavailability of possibly more than 85 medicines, among which 43 can lead to severe adverse effects, such as heart rhythm disorders or respiratory depression (25). This interaction was first discovered with grapefruit juice consumption in the beginning of the 1990s (26) and is often called the "grapefruit juice effect". Since then, grapefruit consumption steadily declined from approximately 2.4 million tons in 1991 to approximately 1.75 million tons in 2009 in the developed countries aware of this effect (27). Yet, citrus fruits also display beneficial effects on health, such as antioxidant properties (28), neuroprotective effects (29) or the reduction of cardiovascular risk (30).

In relation to the undesirable effects of furanocoumarins in humans, different studies have aimed at removing these toxicants from grapefruit juices or citrus essential oils. For example, furanocoumarins can be removed by different extraction and absorption processes (31), degraded by heat treatment (32) or ultraviolet irradiation (33), or removed by the use of autoclaved fungi (34). However, these treatments imply additional costs and might alter the qualities of grapefruit juice or essential oils. Because the furanocoumarin content in plants is determined by the occurrence of specialized genes (35–38) and is therefore highly heritable, an

!

alternative solution for lowering the furanocoumarin concentration in citrus would consist of developing new breeding programs that would allow access to new citrus varieties with low or zero furanocoumarin content.!!

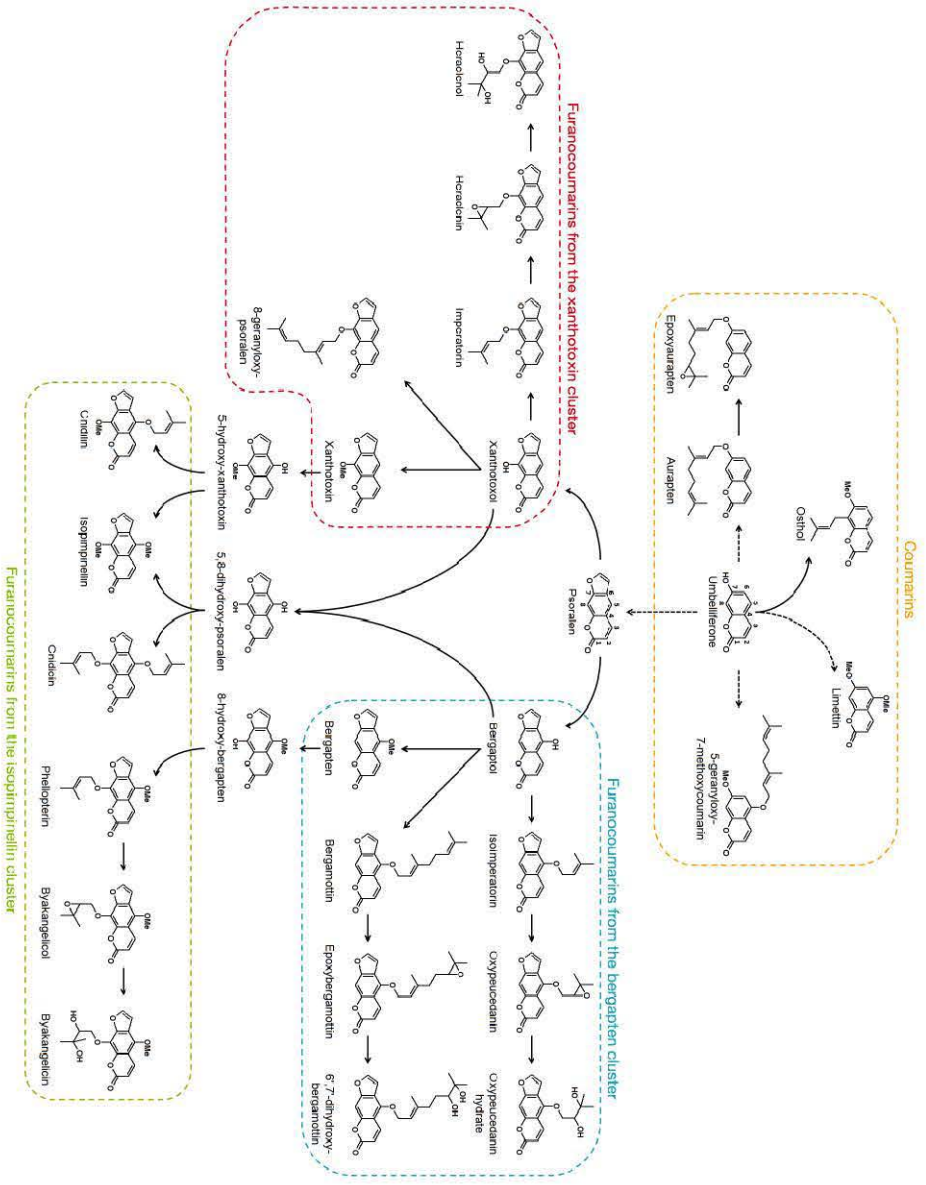


Fig. 1. Schematic representation of the coumarin and furanocoumarin pathways. Solid lines indicate direct enzymatic steps; dashed lines represent multiple enzymatic steps. Coumarins are framed in orange, furanocoumarins of the bergapten cluster are framed in blue, furanocoumarins of the xanthotoxin cluster are framed in red, and furanocoumarins of the isopimpinellin cluster are framed in green.

!

Thus far, several studies have attempted to identify and quantitate coumarins and furanocoumarins in citrus tissue (39–42). However, none of these studies was sufficiently comprehensive regarding the number of chemical compounds and/or citrus varieties that were studied. Thus, a comprehensive study regarding coumarin and furanocoumarin distribution among citrus varieties in terms of both the diversity of chemicals and quantities of compounds synthesized is necessary for building up future breeding projects.

Because our objective was to perform quantitative analyses of already known coumarins and furanocoumarins in citrus, we limited our study to the identification and quantitation of compounds for which authentic standards were available. Under these premises, the present study reports the chemical diversity represented by 27 coumarins and furanocoumarins in 61 *Citrus* varieties from 21 different species (according to Swingle's classification) that are representative of the genetic diversity of all *Citrus*. Our study focused on the sole *Citrus* genus, as it is the largest of the 6 true citrus genera in terms of species number, the most cultivated and the most used by the food and perfume industries. The 4 ancestral taxa were represented by 7 pummelos, 11 mandarins (8 sweet mandarins and 3 acidic mandarins), 3 citrons and 3 papedas. Secondary species were also investigated, with 4 sweet oranges, 4 sour oranges, 3 grapefruits, 4 small mandarin hybrids, 7 lemons, 10 limes, 1 bergamot and 4 other hybrids: Halimii (Mountain), Yuzu, Latipes (Khasi) and Amblycarpa (Nasnaran mandarin). Both citrus peel and pulp were analyzed because the pulp is used for human consumption and because the peel can be used as a flavoring or fragrance ingredient in food and perfumes.

The coumarin and furanocoumarin contents found in citrus peel and pulp samples are compared, and the chemical diversity is discussed with respect to the genetic diversity of the studied varieties and to the organization of the biosynthetic pathways. With reference to the *Citrus* diversity obtained from molecular markers, we highlight the genetic crossings that may have resulted in low coumarin and furanocoumarin content varieties. Finally, the *Citrus* varieties with low coumarin and furanocoumarin content identified in this study will constitute invaluable genetic resources for future breeding programs, promoting new citrus species devoid of these toxic compounds.

Materials and methods

Plant material. Citrus fruits (except *C. micrantha*) were harvested at the *Citrus* Biological Resource Center (CRB CITRUS, INRA-CIRAD, France) at San Giuliano (Corsica, France). *C. micrantha* fruits were harvested at Bachès nursery located in Eus (France). This study included 61 *Citrus* varieties representative of the *Citrus* diversity described in Table 1 and in S1 Table. For each *Citrus* variety, 5 fruits were harvested from the tree.

!

Table 1. List of the accessions investigated in the study and their phylogenetic constitution.

Horticultural group of ancestral species	Swingle's classification system	Phylogenetic constitution	Number of accessions
Papeda	*C. micrantha* Wester	*C. micrantha*	2
Citron	*C. medica* L.	*C. medica*	3
Pummelo	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima*	7
Mandarin	*C. reticulata* Blanco	*C. reticulata*	11
Horticultural group of secondary species	**Swingle's classification system**	**Phylogenetic constitution**	**Number of accessions**
Small mandarin hybrid	*C. reticulata* × *C. sinensis*	*C. reticulata* x ((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*)	1
	C. reticulata × *C. sinensis* ?	*C. reticulata* x ((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*) ?	1
	C. reticulata Blanco	?	1
	(*C. reticulata* × *C. sinensis*) × *C. tangerina*	((*C. reticulata* x ((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*))) x (*C. reticulata* x (*C. maxima* x ((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*)))	1
Sweet orange	*C. sinensis* (L.) Osbeck	(*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*	4
Grapefruit	*C. paradisi* Macf.	*C. maxima* x ((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*)	3
Sour orange	***C. aurantium*** **L.**	***C. maxima* x *C. reticulata***	4
Lemon	***C. limon*** **(L.) Burm. f.**	***(C. maxima* x *C. reticulata)* x *C. medica***	2
		(C. maxima* x *C. reticulata)* x *C. medica* or *((C. maxima* x *C. reticulata)* x *C. reticulata)* x *C. medica	1
		C. reticulata* x *C. medica	4
Lime	***C. aurantifolia*** **(Christm.) Swing.**	***C. micrantha* x *C. medica***	4
		2 (*C. micrantha* x *C. medica*) x *C. medica*	1
		((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. medica*) x 2 (*C. micrantha* x *C. medica*)	2
		(C. maxima* x *C. reticulata)* x *C. medica	2
Bergamot	***C. aurantifolia*** **var Bergamia**	((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. medica*) x (*C. maxima* x *C. reticulata*)	1
Amblycarpa	*C. reticulata* Blanco hybrid	*C. micrantha* x *C. reticulata*	1
Mandarin × citron hybrid	***C. reticulata*** **Blanco var. austera Swing. x *C. medica* L.**	***C. reticulata* x *C. medica***	1
Ichang	*C. ichangensis* Swing.	?	1
Hallmi	***C. hallmii*** **B.C. Stone (Tan. Class.)**	?	1
Yuzu	***C. ichang austera*** **ex. Tan. hybrid**	?	1
Latipes	***C. latipes*** **(Swing.) Tan.**	?	1

Sample preparation. This study was performed on citrus peel and pulp samples. All fruits were harvested and sampled as described previously (39). Briefly, citrus peel samples consisted of the flavedo and albedo tissues, without exceeding 4 mm for the albedo part, as its thickness greatly varies from one species to the other.

Citrus pulp samples only consisted of the juice vesicles, without the walls separating the segments, which were excluded. The only difference for the citrus peel samples is that the citrus pulp was ground for only 2 minutes in the ball mill. Fresh samples were weighed, frozen in liquid nitrogen and stored in a freezer at -80°C until extraction was performed.

Extraction of compounds. The extraction of the compounds from the peel and pulp samples was identical to the method described by Dugrand *et al.* (2013) (39). In brief, frozen samples were lyophilized and ground in a ball mill. Two extractions of the compounds were conducted in 80:20 methanol HPLC-grade/water solutions. The citrus extracts obtained were evaporated and then resuspended in a 75:25 methanol HPLC-grade/ultrapure water solution.

UPLC-MS analyses and data processing. UPLC-MS analyses and data processing were performed with the same equipment and methods described by Dugrand *et al.* (2013) (39). In short, the UPLC separation of the coumarins and furanocoumarins was performed on a C18 reversed-phase column thermostated at 40°C. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in ultrapure water (A) and 0.1% formic acid in methanol (B). The elution gradient was (A:B; v/v): 90:10 at 0 min, 80:20 at 0.74 min, 40:60 at 5.88 min, 10:90 at 10 min, 0:100 between 12 and 16 min, and 90:10 from 16.01 to 20 min. The total analysis lasted 20 min. The flow rate was set at 0.2 mL/min and the injection volume was 3 µL. Concerning the MS system, we used a dual ion source (DUIS). The inlet, desolvatation line and heating block temperatures were respectively set at 350, 250 and 400°C. The voltage of the capillary was set at 4.5 kV. The detection of the compounds was performed in single ion monitoring mode (SIM). Data were acquired and processed on LabSolution software version 5.52 sp2 (Shimadzu).

Method validation. Method validation has been performed for citrus peel samples in our previous work (39) but has not been performed for citrus pulp samples. Full validation of a method includes checking the linearity, limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ), specificity, accuracy, precision and robustness. However, several of these parameters were unchanged between the 2 types of samples studied here (peel *vs.* pulp) and did not need to be repeated. The measurements that did not need to be repeated include the following: (i) the linearity, which concerns the calibration solutions and not the samples themselves; (ii) the accuracy, which was performed as required in a complex matrix devoid of the studied compounds (here, on tomato leaf samples because they do not contain coumarins and furanocoumarins); (iii) the precision; and (iv) the robustness. These latter elements only depended on the equipment. In contrast, the LOD, LOQ, and specificity depended on the matrix containing the chemical compounds and had to be checked again on citrus pulp samples. The LOD, LOQ and specificity were determined using a lime (var. Tahiti, *C. aurantifolia (Christm.) Swing.*) because it

!

contains both high diversity and quantities of coumarins and furanocoumarins in the pulp.

Limits of detection and quantitation in citrus pulp. The LOD and LOQ of a lime pulp sample were determined using the same method as Dugrand and colleagues (2013) (39). Because lime pulp does not contain all 27 of the investigated compounds, this sample was enriched in coumarins and furanocoumarins to confirm the ability to measure the LOD and LOQ for all the studied compounds. The data are presented in S2 Table. The LOD and LOQ values were generally low. Only 6',7'-dihydroxybergamottin, 8-geranyloxypsoralen, byakangelicin and cnidicin had higher limit values. Notably, the LOD and LOQ values in the citrus peel were presented in our previous work (39).

Specificity. A lime pulp sample was prepared and injected into the UPLC-MS system to check its coumarin and furanocoumarin contents. Based on this analysis, we decided to determine the specificity of 6 quantifiable compounds: aurapten, bergapten, oxypeucedanin, oxypeucedanin hydrate, 8-geranyloxypsoralen and isopimpinellin. For this test, 4 additional lime pulp samples (from the same pulp powder) were spiked with these 6 coumarins and furanocoumarins at 25, 50, 75 and 100% of their initial concentrations. Table S2 shows the equations linking the compounds concentrations, the percentages of the initial concentrations added and the linear correlation coefficients. No matrix effect was observed for the coumarins and furanocoumarins in pulp because the linear correlation coefficients of the equations were above 0.99.

Statistical analyses. The data were processed using R statistical software (http://www.R-project.org). The gplots R package and the heatmap function were used to build the heatmaps. The qualitative data (0 for the absence of a given compound and 1 for the presence of this compound) were used to create a profile matrix of the 27 coumarins and furanocoumarins detected by UPLC-MS within the 61 *Citrus* varieties. The quantitative data (means of 5 biological replicates expressed as $mg.kg^{-1}$ fresh weight) were used to build (1) Neighbor Joining (NJ) analyses based on the Range Manhattan dissimilarity index (R pvclust package and pvclust function), (2) Principal components analyses (PCAs) where data were transformed as $\log_{10}(1 + x)$ (R Ade4 package and dudi.pca function) and where accessions of the ancestral taxa were used as active individuals to define the PCA axes and accessions of the secondary species were additional individuals.

Results

General coumarin and furanocoumarin diversity in *Citrus*

In total, 5 coumarins and 21 furanocoumarins were quantitatively determined in the peel and pulp samples of 61 *Citrus* varieties. In addition, 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin was unequivocally determined when present in a sample but could

!

not be quantitated due to the insufficient amount of standard available to establish calibration curves. The coumarin and furanocoumarin contents in the citrus peel and pulp samples are presented in Fig. 2 and Fig. 3, respectively, and are highly variable between the 61 *Citrus* varieties analyzed (see Supporting information, S3 Tables for complete quantitative results). Generally, citrus fruit peel has broader diversity of compounds than the corresponding pulp, as shown by the total numbers of coumarins and furanocoumarins found in the peel (649 occurrences) and pulp (561 occurrences) samples of the 61 studied *Citrus* varieties. Similar to the diversity of compounds, higher compound concentrations were generally found in peel than in pulp (Fig. 2 and Fig. 3). Exceptions to this latter rule, when the pulp appears more concentrated than the peel, were observed in the cases of Deep Red and Pink pummelo and Bouquettier de Nice and Chinotto sour oranges for which the pulp is exceptionally rich in furanocoumarins from the bergapten group (Tables A and G in S3 Tables). Another notable exception was bergamottin, a bergapten-geranylated derivative, which is regularly found more concentrated in the pulp of pummelos (Deep Red, Chandler) and their hybrid grapefruits (Duncan, Marsh) and sour oranges (Maroc, Bouquettier de Nice, Granito) (Tables A, E and G in S3 Tables). Based on the results presented in Fig. 2 and Fig. 3, the highest producers of coumarins and furanocoumarins are 2 papedas: Micrantha (10518 and 1118 mmol kg^{-1} fresh weight in peel and pulp, respectively) and Combava (6136 and 1189 mmol kg^{-1} fresh weight in peel and pulp, respectively). Citrons and some of their descendants (particularly Tahiti, Bears, Alemow, Mexican, Excelsa, Giant and Key limes), pummelos and some of their descendants (grapefruit, sour oranges and bergamot) and Nasnaran also synthesize important amounts of coumarins and furanocoumarins with respect to their peel and pulp contents. Other citron descendants (particularly those for which Micrantha is not related to, *e.g.*, Eureka and Meyer lemons and Marrakech, Palestine, Rangpur and Brazil sweet limes) contain intermediate levels in the peel, compared with extremely low levels in the pulp. Other varieties such as mandarins, small mandarin hybrids, sweet oranges, some limes, some lemons, Ichang papeda and Mountain display low amounts of coumarins and furanocoumarins in both their peel and pulp. As examples, the peel/pulp of Bendiguangju satsuma, Murcott tangor and Shamouti sweet orange present extremely low coumarin and furanocoumarin contents, with 1.85/0.97, 2.10/1.24, and 2.02/1.15 mmol kg^{-1} fresh weight, respectively.

!

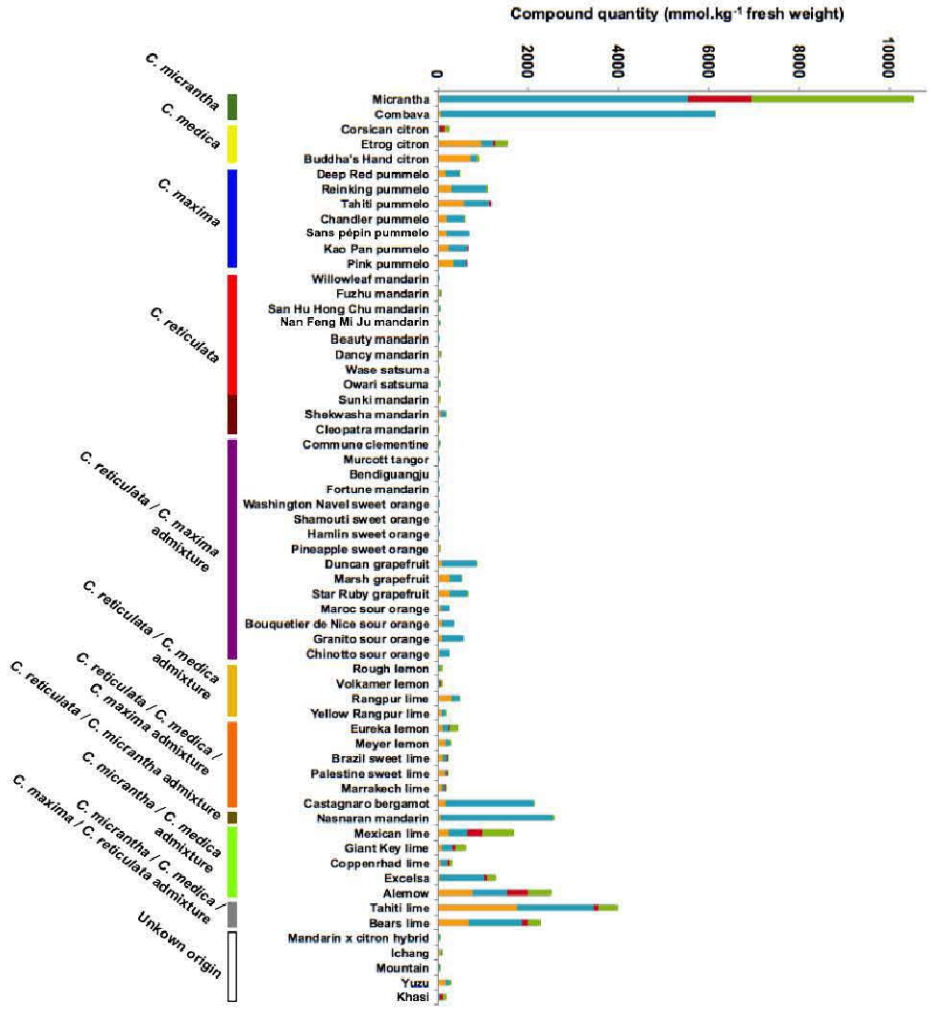


Fig. 2. Coumarin and furanocoumarin quantities (mmol kg^{-1} fresh weight) in the peel extracts of the 61 *Citrus* species investigated. Coumarins are represented in orange; furanocoumarins of the bergapten cluster, in blue; furanocoumarins of the xanthotoxin cluster, in red; and furanocoumarins of the isopimpinellin cluster, in green. Ancestral taxa and secondary species are highlighted in the bottom of the graph. Sweet mandarins are presented in bright red, and acidic mandarins are illustrated in deep red.

!

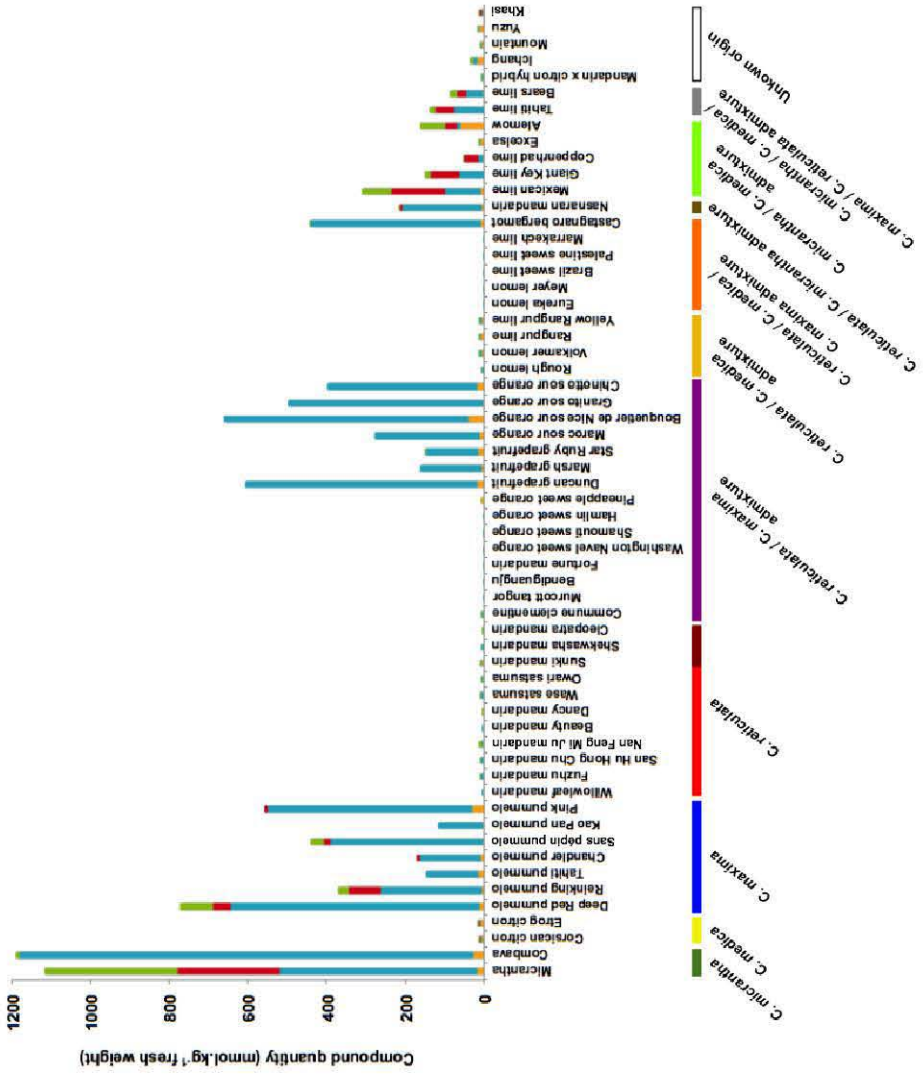


Fig. 3. Coumarin and furanocoumarin quantities (mmol kg^{-1} fresh weight) in the pulp extracts of the 61 *Citrus* species investigated. Coumarins are represented in orange; furanocoumarins of the bergapten cluster, in blue; furanocoumarins of the xanthotoxin cluster, in red; and furanocoumarins of the isopimpinellin cluster, in green. Ancestral taxa and secondary species are highlighted in the bottom of the graph. Sweet mandarins are presented in bright red, and acidic mandarins are illustrated in deep red.

Heatmap representations associated with hierarchical ascendant classifications (HACs) were chosen to establish classifications and correlations

!

between the chemotypes and *Citrus* varieties. Heatmaps were constructed based on the sole presence or absence (0 for the absence of the compound and 1 for the detection of the compound) of each of the coumarins/furanocoumarins (5-geranyloxy-7-methoxycoumarin included). This analysis allowed the chemotypes observed for the peel (Fig. 4) and for the pulp (Fig. 5) in all *Citrus* varieties to be summarized.

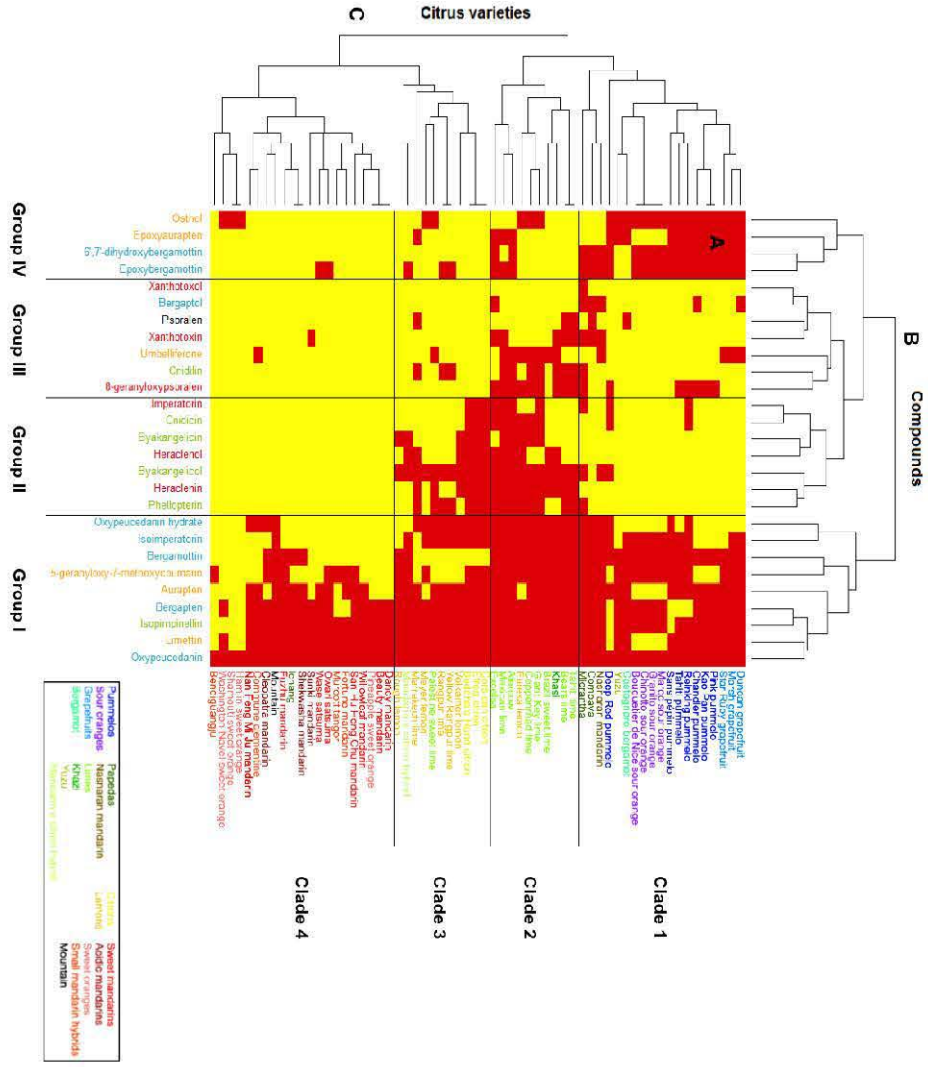


Fig. 4. Heatmap displaying the coumarin and furanocoumarin profiles in the peel of the 61 *Citrus* species investigated. A: heatmap; B: dendrogram of compounds; C: dendrogram of *Citrus* varieties. A red square highlights the presence of a given compound, while a yellow square shows its absence. Coumarins are represented in orange; furanocoumarins of the bergapten cluster, in blue; furanocoumarins of the xanthotoxin cluster, in red; and furanocoumarins of the isopimpinellin cluster, in green.

!

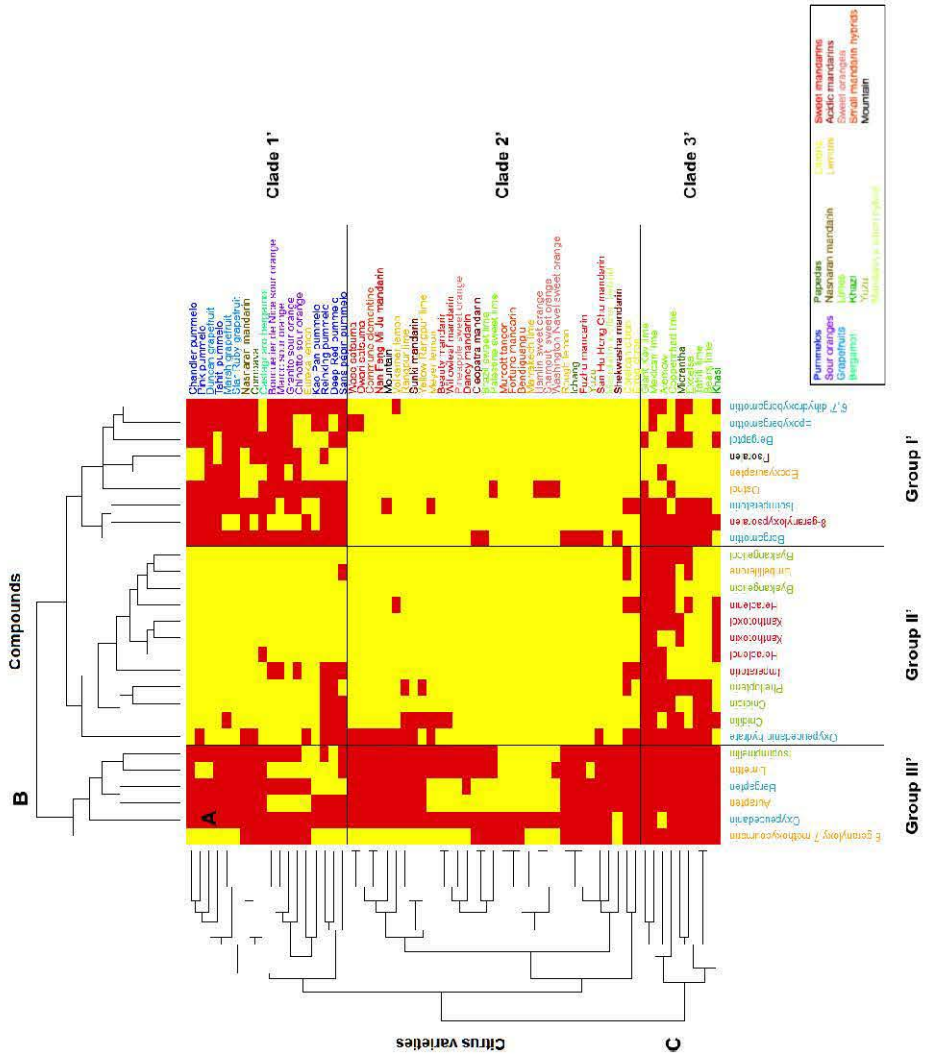


Fig. 5. Heatmap displaying the coumarin and furanocoumarin profiles in the pulp of the 61 *Citrus* species investigated. A: heatmap; B: dendrogram of compounds; C: dendrogram of *Citrus* varieties. A red square highlights the presence of a given compound, while a yellow square shows its absence. Coumarins are represented in orange; furanocoumarins of the bergapten cluster, in blue; furanocoumarins of the xanthotoxin cluster, in red; and furanocoumarins of the isopimpinellin cluster, in green.

Based on the largest compound diversity found in peel (heatmap, Fig. 4A), coumarins and furanocoumarins were classified by HACs into 4 different subgroups (dendrogram, Fig. 4B).

Group I is composed of 3 coumarins (aurapten, limettin, and 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin), bergapten and all its dimethylallylated derivatives (isoimperatorin,

!

oxypeucedanin, and oxypeucedanin-hydrate), and the geranylated compounds bergamottin and isopimpinellin. This group includes the most widespread coumarins/furanocoumarins in the *Citrus* species studied, as exemplified by oxypeucedanin, which was ubiquitously found in the peel of all 61 investigated varieties.

Group II is composed of xanthotoxin dimethylallylated compounds (imperatorin, heraclenin, and heraclenol) associated with isopimpinellin dimethylallylated derivatives, where DMAPP is attached to the oxygen bound to C8 (phellopterin, byakangelicol, byakangelicin, and cnidicin).

Group III includes parent compounds such as psoralen, bergaptol, xanthotoxol and umbelliferone, which subsequently generate additional diversified compounds in the coumarin/furanocoumarin pathways. Group III also contains cnidilin, a double DMAPP-derivative of isopimpinellin, and 8-geranyloxypsoralen. Group III includes some of the most scarcely found coumarins/furanocoumarins among the studied *Citrus* varieties.

Group IV is composed of two coumarins, osthol and epoxyaurapten, which are associated with two bergapten geranylated compounds (epoxybergamottin and 6-7-dihydroxybergamottin). Compounds from group IV are less common in *Citrus* varieties and are restricted to some horticultural groups.

The distribution of coumarins and furanocoumarins in citrus pulp (heatmap Fig. 5A) significantly differs from that previously described in the peel (heatmap, Fig. 4A). In pulp, coumarin/furanocoumarin classifications are only limited to 3 groups (dendrogram, Fig. 5B), denoted as I', II', and III' to avoid confusion with the groups described previously in Fig. 5.

Group I' is composed of the coumarins osthol and epoxyaurapten and the furanocoumarins psoralen, the 5 other compounds from the bergapten cluster (prenylated and geranylated forms) and 8-geranyloxypsoralen. Most of the compounds from group I' are geranylated forms.

Group II' contains the coumarin umbelliferone, the furanocoumarin oxypeucedanin hydrate, the compounds from the xanthotoxin cluster (except 8-geranyloxypsoralen) and the prenylated compounds of the isopimpinellin cluster. These coumarins and furanocoumarins from group II' are primarily dimethylallylated compounds.

Group III' includes compounds that can be found in many *Citrus* fruits: the coumarins 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin, aurapten and limettin and the furanocoumarins oxypeucedanin, bergapten and isopimpinellin. Compounds from group III' are the most widespread in citrus pulp samples.

!

Organization of *Citrus* diversity based on coumarin and furanocoumarin contents in peel

Based on the largest compound diversity found in peel (heatmap, Fig. 4A), *Citrus* varieties can be classified by HACs into 4 clades (dendrogram, Fig. 4C).

Clade 1 gathers *Citrus* from the pummelo group, *i.e.*, 7 pummelos and pummelo hybrids (3 grapefruits, 4 sour oranges, and 1 bergamot), which are associated with 2 papedas (Combava, Micrantha) and 2 other hybrids: Yuzu and Nasnaran. These varieties primarily synthesize compounds from the groups I and IV, including all the coumarins biosynthetically originating from the parent compound umbelliferone (osthol, epoxyaurapten, aurapten, limettin, 5-geranyloxy, and 7-methoxycoumarin; Fig. 1) and furanocoumarins from the bergapten cluster: bergapten, bergaptol and its geranylated derivatives (bergamottin, epoxybergamottin and 6',7'-dihydroxybergamottin), and its dimethylallylated derivatives (isoimperatorin, oxypeucedanin and oxypeucedanin hydrate; Fig. 4A).

Clade 2 is characterized by the presence of limes (except Palestine), the Khasi hybrid and the Eureka lemon. Compared to the other *Citrus* groups, clade 2 exhibits the greatest coumarin/furanocoumarin diversity as shown in the heatmap representation (Fig. 4A), where a large assortment of prenylated coumarins and furanocoumarins derived from bergapten, xanthotoxin and isopimpinellin parent compounds (all 4 groups represented) is displayed.

Clade 3 is composed of the citron group, *i.e.*, the 3 citrons, the lemons (except Eureka) and the Palestine sweet lime. This clade also includes the mandarin × citron hybrid. Fruit peels from clade 3 are characterized by the occurrence of prenylated coumarins associated with prenylated furanocoumarins from the bergapten, xanthotoxin and isopimpinellin clusters (Fig. 4A). This clade 3 chemotype is quite comparable to that found in clade 2, although coumarins and furanocoumarins from the previously described groups III and IV are less represented in clade 3.

Clade 4 is composed of all the mandarins (sweet and acidic), all the small mandarin hybrids, all the sweet oranges, Ichang papeda and the Mountain hybrid. Clade 4 includes species that are characterized by limited chemotype diversity, primarily restricted to compounds associated previously with group I (prenylated coumarins and furanocoumarins from the bergapten cluster, Fig. 4A).

In addition to qualitative analyses, we used the quantitative results of coumarins and furanocoumarins contents in citrus peel to analyze the implication of phylogenetic origins on coumarins and furanocoumarins contents. NJ analyses and PCAs were performed for this purpose. The four ancestral taxa (mandarins, pummelos, papedas and citrons) could be perfectly separated in the NJ analysis based on the quantitative data of coumarins and furanocoumarins in citrus peel (Fig. 6). On this NJ analysis, bootstrap values are quite high (91 for mandarins, 71 for pummelos and papedas and 79 for citrons; Fig. 6), which demonstrates that it is a strong representation of the structure of citrus diversity. Based on this strong structuration of coumarins and furanocoumarins contents between the four ancestral taxa, we analyzed the coumarins and furanocoumarins contents of the secondary

!

species according to their phylogenomic contents by PCA analysis, using ancestral taxa accessions as active individuals and secondary species accessions as additional individuals.

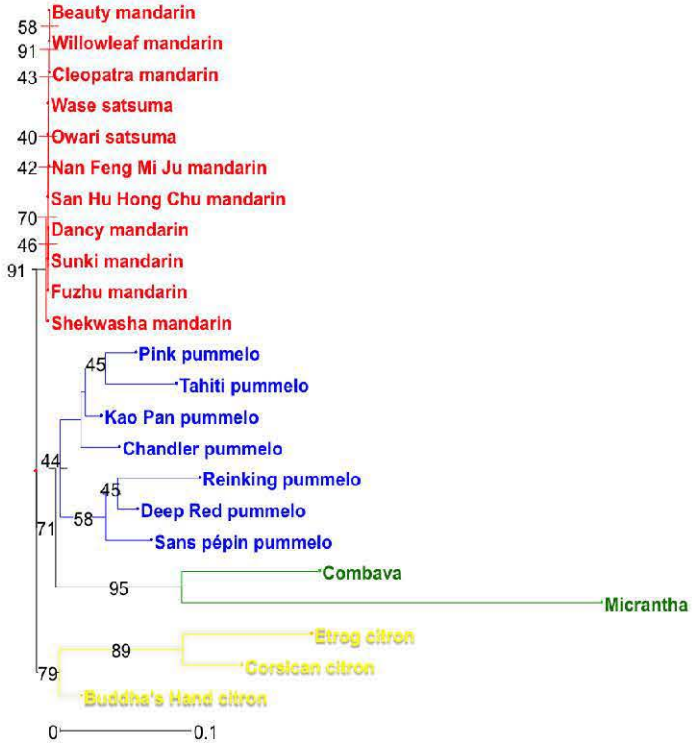


Fig. 6. NJ analysis of the 23 citrus varieties belonging to the 4 ancestral taxa based on the coumarins and furanocoumarins contents in peel expressed as mg.kg^{-1} fresh weight. Numbers in black represent the bootstrap probability values. The colors correspond to the phylogenetic constitution of the varieties and are indicated in Figs. 2 and 3.

When using the accessions of the four ancestral taxa, the very high coumarins and furanocoumarins content of papedas (*C. micrantha* and *C. hystrix*) and some of their hybrids resulted in a very strong impact of these accessions on the PCA axes definition (S1 Fig.), even though the quantitative data were transformed as $\log_{10}(1 + x)$. As a result, the resolution of the differentiation between the three other basic taxa was low and thus the relative position of secondary species difficult to infer (S1 Fig.). Therefore, to analyze the organization of coumarins and furanocoumarins contents of the three other ancestral taxa (pummelos, mandarins and citrons) and their respective hybrids, we performed a PCA analysis with only the corresponding accessions (Fig. 7). The structure of the diversity of citrus varieties is well represented on the first two axes of this PCA with a value above 67% (Fig. 7). Pummelos, mandarins and citrons are well separated on the PCA and the secondary

!

species are well distributed among these ancestral taxa (Fig. 7A). For exemple, varieties with a *C. maxima* × *C. reticulata* admixture structure are placed on an axis between these 2 taxa. In the same way, the citrus varieties with a *C. medica* × *C. reticulata* admixture structure genome are distributed between these 2 ancestral taxa. Pummelos, grapefruits and sour oranges are characterized by their peel content in dimethylallylated coumarins (aurapten, epoxyaurapten and osthol) and dimethylallylated furanocoumarins from the bergapten cluster essentially (bergamottin, epoxybergamottin and 6', 7'- dihydroxybergamottin) (Fig. 7B). In contrast, citrons, lemons and limes are characterized by their peel content in limettin and in dimethylallylated furanocoumarins from the xanthotoxin cluster (imperatorin, heraclenin and heraclenol) and from the isopimpinellin cluster (phellopterin, byakangelicol and byakangelicin) (Fig. 7B). Mandarins, sweet oranges and mandarin hybrids are poor producers of coumarins and furanocoumarins, even though they produce isopimpinellin and bergapten (Fig. 7B).

The PCA with the four basic taxa (S1 Fig.) reveal the position of papeda hybrids that are placed between papedas and citrons. The coumarins and furanocoumarins contents of Alemow and Mexican limes place them closer to citrons than papedas, while Nasnaran is closer to papedas than to mandarins (S1 Fig.).

Organization of *Citrus* diversity based on coumarin and furanocoumarin contents in pulp

The identification of coumarins and furanocoumarins in the pulp allowed 3 clades (Fig. 5C) to be distinguished instead of the 4 described previously based on the peel content (Fig. 4C). For clarity between Figs. 5C and 4C, these 3 new clades are nominated 1', 2', and 3'.

Clade 1' is composed of the 7 pummelos, the 4 sour oranges, the 3 grapefruits, the Combava, the Bergamot, the Nasnaran mandarin and the Eureka lemon. Clade 1' is composed of the same varieties found previously in clade 1 (Fig. 4C), with the exception of Yuzu and Micrantha, which are found only in clade 1, and the Eureka lemon, which is restricted to clade 1'. The pulp of these varieties primarily contains prenylated coumarins and prenylated derivatives from the bergapten cluster classified in groups I' and III'.

Clade 2' includes all the sweet and acidic mandarins, all the small mandarin hybrids, all the sweet oranges, the lemons (except Eureka), 2 limes (Brazil and Palestine), the 2 citrons for which the pulp compartment could be investigated (NB: due to the absence of pulp in Buddha's Hand citron fruits, no investigation could be conducted in the pulp of this third citron variety), Ichang, Mountain, Yuzu and the mandarin × citron hybrid. Clade 2' is composed of varieties classified previously in clades 1 (Yuzu), 2 (Brazil sweet lime), 3 (citrons, lemons and limes) and 4 (mandarins, small mandarin hybrids, sweet oranges, Mountain and Ichang) based on the peel chemotype. Varieties from clade 2' show the narrowest diversity in coumarins and furanocoumarins in the fruit pulp, primarily restricted to the compounds classified in group III'.

!

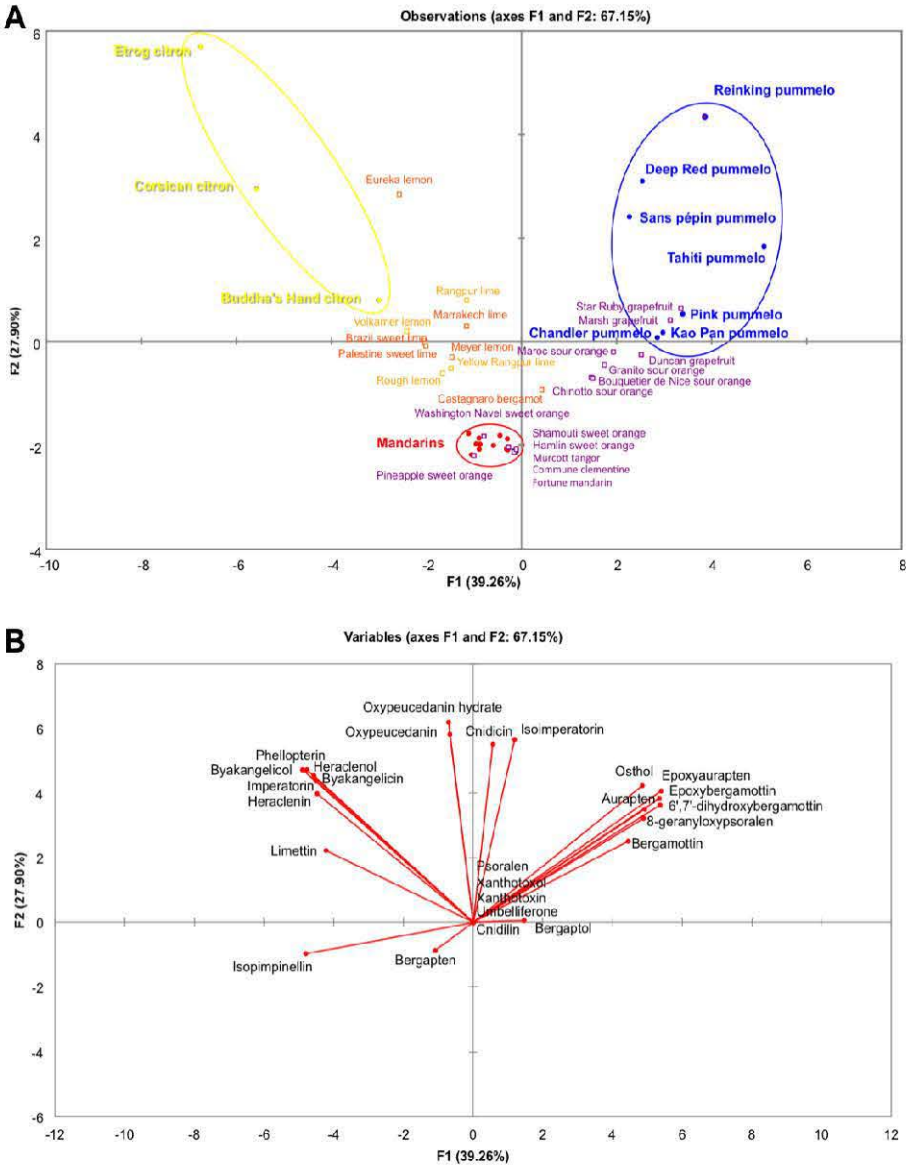


Fig. 7. PCA representation of the citrus varieties belonging to the 3 ancestral taxa pummelos, mandarins and citrons and their respective hybrids based on the coumarins and furanocoumarins contents in peel expressed as mg.kg^{-1} fresh weight. A: Distribution of the observations (citrus varieties); B: Distribution of the variables (coumarins and furanocoumarins). Ancestral taxa were used as active individuals (circles) to build the PCA, while secondary species are supplementary individuals (squares). Quantitative data were transformed as $\log_{10}(1 + x)$. The colors correspond to the phylogenetic constitution of the varieties and are indicated in Figs. 2 and 3.

!

Clade 3' contains the limes (except Brazil and Palestine), the Micrantha papeda and Khasi. These varieties are associated with clades 1 (Micrantha) and 2 (limes and Khasi) established previously from the peel chemotype. The pulp observed from clade 3' varieties shows the most diversified chemotypes, with coumarins and furanocoumarins belonging to groups I', II', and III'. In particular, dimethylallylated compounds from the xanthotoxin cluster (*i.e.*, imperatorin, heraclenin, and heraclenol), as well as the parent compound xanthotoxol and its methoxylated derivative xanthotoxin, are exclusively restricted to some of the clade 3' fruit pulp.

As we did before, the quantitative data of coumarins and furanocoumarins contents in citrus pulp were used to build a NJ analysis between the four ancestral taxa. This NJ analysis displays a weak representation of the structure of citrus diversity, with low bootstrap values for the main branching and incomplete differentiation between the four basic taxa (S2 Fig.). Therefore, citrus pulp coumarins and furanocoumarins contents are not strongly related with phylogenetic differentiation. Thus we do not performed analysis to study the relationship of coumarins and furanocoumarins contents on secondary species and their phylogenetic origin.

Discussion

Peel presents the richest coumarin/furanocoumarin content

The results obtained from the peel and pulp of the 61 studied varieties clearly demonstrate that the envelope of the fruit is the richest part in terms of both molecular diversity (Fig. 4 *vs.* Fig. 5) and compound concentration (Figs. 2 and 3, Tables A to L in S3 Tables). Peel prominence regarding coumarin and furanocoumarin contents must be related to the presence of lysogenic cavities in the flavedo (*i.e.*, pigmented pericarp of the peel), where large quantities of essential oils and polyphenolics are stored. The occurrence of specialized cells involved in the biosynthesis of coumarins and furanocoumarins has been hypothesized in young grapefruits (*C. paradisi* 'Duncan') (43): epithelial cells surrounding the secretory cavities show a high level of transcripts potentially committed to the biosynthetic routes, which most likely reflects their specialization for coumarin and furanocoumarin biosynthesis. Future studies aimed at classifying *Citrus* varieties based on coumarin/furanocoumarin chemotypes should be limited to the peel compartment only.

!

Coumarin and furanocoumarin diversity found in *Citrus* reflects the organization of the biosynthetic pathways

Qualitative studies are useful to understand the organization of the biosynthetic pathways, as they reflect the ability of varieties to produce different metabolites. HACs based on the presence/absence of coumarins/furanocoumarins in peel allowed 4 categories of compounds to be distinguished (Fig. 4B, groups I to IV). Each group is logically structured with coumarins and furanocoumarins engaged in the same cascade of enzymatic reactions (*i.e.*, groups of substrates and products either leading to the same reaction end product or originating from the same precursor compound).

Group I is composed of one dimethylallylated coumarin (aurapten), one geranylated coumarin (5-geranyloxy, 7-methoxycoumarin) and one dimethoxy coumarin (limettin). All these products originate from the biosynthetic transformation of the parent compound umbelliferone. In accordance with the rule that substrates and products from the same biosynthetic route are regrouped, group I is composed of the 3 prenylated derivatives that form after the dimethylallylation of bergaptol (*i.e.*, isoimperatorin, oxypeucedanin, and oxypeucedanin hydrate) and one prenylated derivative (bergamottin) that forms after the geranylation of the same bergaptol.

Notably, group I has the C5, C8 dimethoxylated furanocoumarin isopimpinellin and the C5 mono-methoxylated bergapten, both of which are ubiquitously found in *Citrus*, whereas xanthotoxin, the C8-isomer of bergapten that occurs in group III, is primarily restricted to *Citrus* from clade 2 (limes and papedas). At present, the route leading from psoralen to isopimpinellin is not established, and whether isopimpinellin is formed after C5 methoxylation of xanthotoxin, C8 methoxylation of bergapten, or after both is unknown (16,35). Based on our data regarding the strong co-occurrence of isopimpinellin and bergapten, isopimpinellin is likely derived from bergapten in *Citrus*.

Interestingly, the 3 compounds that form after *O*-geranylation of bergaptol (bergamottin ✐ epoxybergamottin ✐ 6', 7', dihydroxybergamottin) are not clustered in the same group: bergamottin (*i.e.*, 5 geranyloxy-psoralen), the first compound, is located in group I, and the latter 2 epoxy derivatives are in group IV. Symmetrically, group IV contains epoxyaurapten, another epoxy derivative for which the parent geranyloxy compound (aurapten) is located in group I. Because compounds from group I are represented in almost all *Citrus* accessions and because compounds from group IV are principally limited to pummelos and their hybrids, it is tempting to hypothesize that the enzymes responsible for the synthesis of *O*-geranylated compounds (*i.e.*, aromatic *O*-prenyltransferases) might be ubiquitously spread in *Citrus*, whereas the enzymes in charge of the synthesis of the two epoxydes (epoxybergamottin and epoxyaurapten) and of 6',7',dihydroxybergamottin might be more scarcely distributed and restricted to the pummelo group (clade 1). Group IV also includes osthol, the unique *C*-prenylated compound investigated in this study. Notably, the distribution of this *C*-prenylated structure is much more limited than other *O*-prenylated coumarins (aurapten, 5-geranyloxy, and 7-methoxycoumarin), although

!

it is difficult to draw general conclusions regarding the distribution *C vs. O* prenyltransferases due to the lack of *C*-prenylated compounds analyzed in this study.

Group II is exclusively composed of *O*-prenylated compounds characterized by a dimethylallyloxy chain bound at C8 of the furanocoumarin core structure. These compounds include imperatorin, heraclenin, and heraclenol from the xanthotoxin cluster and cnidicin, phellopterin, byakangelicol, and byakangelicin from the isopimpinellin cluster. They are principally found in *Citrus* clade 2 (limes and papedas) and clade 3 (citrons, lemons, and sour limes). Whether a single aromatic *O*-prenyltransferase might operate on multiple substrates such as xanthotoxol and 8-hydroxybergapten or whether different enzymes are engaged in the synthesis of imperatorin and phellopterin remain unknown. This point is presently difficult to address because the number of aromatic prenyltransferases described from plants thus far is limited to only seven. Notably, five of these seven aromatic prenyltransferases appear to be extremely specific regarding the prenyl donors that they accept (DMAPP, GPP) (44–46,38), whereas 2 prenyltransferases described recently from hop plant show affinity for both DMAPP and GPP (47). Four of these enzymes also demonstrate a high specificity for prenyl acceptors, as they only tolerate a single aromatic entity as a substrate (44–46,38), including a *C*-prenyltransferase described recently from lemon that is involved in the synthesis of 8-geranylumbelliferone (46). A 5th enzyme isolated from *Sophora flavescens* accepts more promiscuous aromatic substrates, as it is able to prenylate 2 structurally close isoflavones: genistein and its methylated derivative biochanin A (45). Consistent with this *Sophora flavescens* enzyme, the two hop prenyltransferases described recently show affinity for different substrates such as acylphloroglucinols and naringenin chalcone (47).

Group III primarily contains intermediate compounds that are subsequently transformed into prenylated/methoxylated/epoxydated derivatives such as psoralen, xanthotoxol, bergaptol, xanthotoxin, and umbelliferone. These intermediate compounds are the most scarcely found among citrus fruit peel (Fig. 4A) because they are rapidly converted into more chemically diverse end products. Group III also includes cnidilin and 8-geranyloxypsoralen, two prenylated compounds rarely found in *Citrus*.

Coumarin and furanocoumarin chemical diversity in relation to the recent advances in *Citrus* phylogeny

Based on molecular markers and sequencing, 4 ancestral taxa, *C. maxima*, *C. medica*, *C. reticulata* and *C. micrantha*, have been identified in *Citrus* (8,10,12,14). These basic taxa also could be well distinguished based on the coumarins and furanocoumarins contents in their peel (Fig. 6). Ancestral taxa present no evidence of interspecific introgression, except in sweet mandarin, which presents approximately 10% introgression of *C. maxima* (13,14). However, the acidic mandarin 'Cleopatra', 'Sunki' and 'Shekwasha' present no evidence of introgression (14). The coumarin and furanocoumarin chemotypes observed in fruit peel and pulp were compared

!

within the 4 ancestral taxa and were relatively homogeneous inside the taxa, except in papedas. *C. maxima* presents relatively high coumarin and furanocoumarin contents characterized by the presence of all coumarins and bergapten-related compounds (bergapten, bergaptol and its geranylated derivatives, bergamottin, epoxybergamottin, and 6',7'-dihydroxybergamottin) (Figs. 2 and 3, Table A in S3 Tables). *C. reticulata* presents the lowest coumarin and furanocoumarin contents (Figs. 2 and 3, Table D in S3 Tables). This taxon is characterized by the total absence of xanthotoxin in peel and pulp. No difference was observed between sweet and acidic mandarin. *C. medica* is characterized by the occurrence of prenylated coumarins associated with prenylated furanocoumarins from bergapten, xanthotoxin and isopimpinellin clusters (Figs. 2 and 3, Table B in S3 Tables). The Papeda taxon is not cultivated, except Combava, and remains the least known of all ancestral taxa. Only few genetic resources for this group are available in the different germplasm banks in the world, and extreme profiles can be observed within this group. Micrantha and Combava present the highest furanocoumarin content (from bergapten, xanthotoxin and isopimpinellin) (Figs. 2 and 3, Table C in S3 Tables). However, we must keep in mind that Micrantha was harvested outside Corsica, where all other samples were collected, and that different pedo-climatic conditions might influence coumarin and furanocoumarin synthesis (48). In contrast, Ichang papeda, also considered a true papeda, has very low coumarin and furanocoumarin contents (Figs. 2 and 3, Table C in S3 Tables). In different studies (8,15), *C. ichangensis* (Ichang papeda) is grouped with the wild mandarins *C. tachibana* and *C. mangshanensis*. Unfortunately, these wild mandarins were unavailable to our study because these genotypes are only present in Asia. However, these species are considered genetically distinct from other mandarins although they clustered with them. Our results are concordant with these studies, as *C. Ichangensis* is localized with all the mandarin accessions.

All other species result from hybridization between these 4 ancestral taxa. The coumarins and furanocoumarins found in these secondary species display contrasting molecular diversity associated with variable quantitative traits. Many of these species, such as *C. sinensis*, *C. aurantium*, *C. paradisi*, and tangors, originate from *C. reticulata* x *C. maxima* hybridization, with variable contributions of each taxon. For the tangors, the contribution of *C. reticulata* is higher (from 63% to 89%) (49). *C. sinensis* presents a contribution of 60% of *C. reticulata* and 40% of *C. maxima*, *C. aurantium* 50% and 50%; and *C. paradisi* approximately 40% and 60% respectively (49). Mandarin hybrids (tangors) and sweet orange, closely related to mandarins, are logically present in the coumarin/furanocoumarin mandarin clade (clade IV, Fig 4C). In the same way, these secondary species are closer to the mandarin cluster on the PCA based on the citrus peel content in coumarins and furanocoumarins (Fig. 7A). This taxonomical group is of special interest because it contains the lowest coumarin and furanocoumarin producers amongst all the studied *Citrus* species. In contrast, *C. aurantium* and *C. paradisi* have similar coumarin and furanocoumarin profiles compared with *C. maxima* (Figs. 4C, clade I and 7A). All

!

these results show a strong concordance between phytochemical and molecular data.

C. limon (Swingle and Reece taxonomy) is more complex and originates from 2 or 3 taxa hybridization. *C. limon* can result from a direct hybridization between *C. medica* and *C. reticulata* ('Volkamer lemon', 'Rough lemon' and 'Rangpur' lime) or more complex hybridization between 3 ancestral taxa, *C. medica*, *C. reticulata*, and *C. maxima* ('Meyer', 'Eureka' lemons and Marrakech lime) (49). Most of these species are present in the same clade 3 as citron (*C. medica,* Fig. 4C) or are placed on an axis between the citron and mandarin clusters on the PCA based on the quantitative results in citrus peel (Fig. 7A).

Similarly, *C. aurantifolia* originates from different taxa hybridization (2 to 4 taxa) composed systematically of citron and papeda taxons. 'Alemow', 'Excelsa', Mexican' and Giant key limes display extremely similar phylogenomic origins, with close to 50% contributions from *C. medica* and *C. micrantha* (14). *C. aurantifolia* 'Palestine' and 'Brazil' sweet lime have phylogenetic structures similar to *C. limon* ('Meyer', 'Eureka' lemons, and 'Marrakech' lime). *C. aurantifolia* 'Palestine' and 'Brazil' sweet lime contains close to 50% *C. medica* and displayed 2 other ancestral taxa, *C. reticulata* and *C. maxima*, with a greater contribution from *C. reticulata* (32–34%) than *C. maxima* (15–20% in 'Palestinian' sweet lime) (14,49). Coppenrhad lime is a triploid originating from a (*C. micrantha x C. medica)* x *C. medica* hybridization with a diploid gamete of the *C. micrantha x C. medica* parent (49). Tahiti and Bearss lime, which are also triploid, have contributions from the 4 ancestral taxa (1/6 *C. maxima*, 1/3 *C. medica*, 1/3 *C. micrantha* and 1/6 *C. reticulata*) (49). All of these secondary species containing Papeda, except Palestine sweet lime, are grouped in the same clade 2 Fig. 4 C), indicating that our phytochemical data are consistent with the recent molecular data cited previously. The mandarin × citron hybrid is a simple hybrid of *C. medica x C. reticulata* (49) as Rough lemon, Rangpur lime and Volkamer lemon. This hybrid has similar profiles as the coumarin and furanocoumarin citron profiles and is grouped in clade 3 (Fig. 4C).

Bergamot is considered to have emerged from a lemon X sour orange crossing and contains 40% of pummelo (49), which is consistent with its position in the pummelo clade. In the same way, bergamot is placed between pummelos and mandarins, close to the sour oranges, on the PCA based on the quantitative results of coumarins and furanocoumarins in peel (Fig. 7A). With reference to our survey, this finding could be due to the persistence of some chemical compounds that might have been inherited from pummelo such as osthol, epoxyaurapten and bergamottin (Figs. 4 and 7).

The origin of the Mountain hybrid remains undetermined; however, this hybrid has the same maternal origin as papeda (10). Yuzu might be derived from the hybridization between Ichang papeda and a mandarin (5). These 2 hybrids are present in the mandarin clade, which also contains the Ichang papeda displaying extremely low coumarin and furanocoumarin contents. Thus, based on our phytochemical data, these hybrids are most likely derived from Ichang papeda and/or mandarin.

!

The Khasi hybrid displays coumarin and furanocoumarin profiles similar to Micrantha papeda, allowing us to draw the hypothesis of affiliation with this cultivar.

Nasnaran mandarin is a direct mandarin-papeda hybrid (14) with a papeda mitotype (10). This hybrid presents a strong papeda fragrance, although it looks similar to a mandarin. Here, its profile is more closely related to papedas, particularly Combava, which might suggest a parental link between them.

In brief, all secondary species resulting from a cross directly involving the ancestral taxa *C. maxima* (sour oranges and grapefruits), *C. reticulata* (sweet oranges and some tangors), *C. medica* (some lemons) or *C. micrantha* (some limes and Nasnaran mandarin) present coumarin and furanocoumarin profiles similar to the parent ancestral taxa, with a prevalence of the chemotypes found in pummelos, citrons and papedas over mandarins and, identically, a prevalence of the chemotypes found in papedas over citrons. These findings constitute valuable information for future breeding programs that will allow the coumarin and furanocoumarin contents in *Citrus* species to be reduced.

Breeding programs for selection against coumarins and furanocoumarins in *Citrus*: Global and targeted approaches

We observed previously that the lowest coumarin and furanocoumarin contents are found in sweet and acidic mandarins and most of their hybrids (including sweet oranges and small mandarin hybrids), Ichang papeda and the 2 hybrids Yuzu and Mountain. In contrast, pummelos, citrons and papedas, which contain the highest quantities of coumarins and furanocoumarins, generate hybrids that are themselves rich in these compounds. This finding led us to hypothesize that breeding programs aimed at decreasing the toxic coumarin and furanocoumarin contents in *Citrus* should preferentially involve mandarins or Ichang papeda. *C. sinensis* is a good example of the possibility of obtaining a low coumarin and furanocoumarin hybrid from *C. reticulata*, although it has a relatively high genetic background from pummelo (40%) (14). This hypothesis is in agreement with a study evaluating the inhibition of the CYP3A4 by immature *Citrus* fruit extracts (50). In this work, *C. paradisi* was shown to be the most effective inhibitor of CYP3A4, while *C. unshiu* displayed relatively weak inhibition of the cytochrome most likely due to low furanocoumarin content. Other *Citrus* fruits were tested; their capacities to inhibit CYP3A4 are ordered as follows: *C. paradisi* > *C. limon* > *C. aurantium* > *C. grandis* (also called *C. maxima*) > *C. reticulata* > *C. sinensis* > *C. unshiu* (50). This order is globally consistent with our quantitative results, considering that the coumarin and furanocoumarin contents vary greatly from one species to another and depend on environmental conditions.

Pummelos are high producers of geranylated compounds from the bergapten cluster: bergamottin, epoxybergamottin and 6',7'-dihydroxybergamottin. These chemical compounds are phototoxic and are strong inhibitors of CYP3A4 (20,51,52). Sour oranges and grapefruits are direct descendants of pummelos that also produce these 3 compounds, and their other parents (sweet mandarin and sweet orange, respectively) generally do not produce them. Therefore, we can hypothesize that crosses involving pummelos and mandarins or sweet oranges usually include the toxic furanocoumarins bergamottin, epoxybergamottin and 6',7'-dihydroxybergamottin

!

(Fig. 8). This is in accordance with a recent statement issued by Xu and coworkers, who confirmed that pummelos as parents have a definite contribution to the furanocoumarins content (bergapten, bergamottin, epoxybergamottin and 6',7'-dihydroxybergamottin) of grapefruits (42). However, sweet oranges and small mandarin hybrids that have a greater contribution of *C. reticulata* in their genotype have lost the capacity to produce these 3 compounds (Fig. 8). This finding suggests that the genes encoding the enzyme machinery involved in the biosynthesis of bergamottin, epoxybergamottin and 6',7'-dihydroxybergamottin in pummelos might be dominant and transmitted to their direct hybrid progenies. This hypothesis of dominant genes is consistent with molecular data regarding coumarin/furanocoumarin biosynthesis available to date, where the capacity to synthesize such compounds is given by very specific enzymes encoded by specialized genes such as dioxygenases, prenyltransferases, and cytochrome P450s (35–38,46).

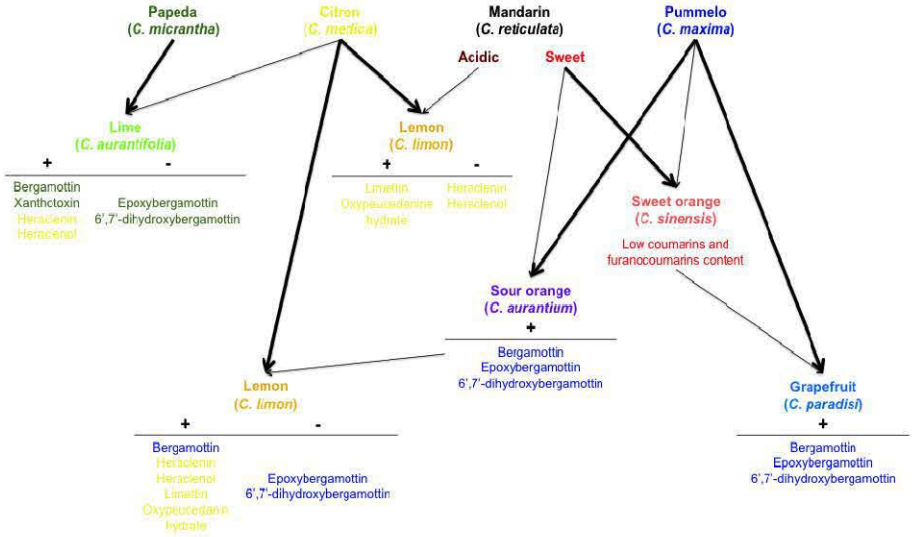


Fig. 8. Schematic representation of coumarin/furanocoumarin inheritance from the 4 ancestral taxa (pummelo, mandarin, citron, and papeda) in the cultivated *Citrus* species. Parental relations between species are illustrated by arrows. Thick arrows represent high chemotype similarities between hybrids and their ascendants. Same colors were used as in Fig 4 and 5 for representing *Citrus* species. Coumarins and furanocoumarins are indicated in the same color as the ancestral taxon that transmitted them to their descendants. The symbol "+" indicates the probable transmission of compounds in the secondary species, while the symbol "-" indicates their disappearance.

Crosses involving citrons are interesting, with the objective to primarily remove the toxic epoxybergamottin and 6',7'-dihydroxybergamottin introduced by pummelos (see lemon progenies: Eureka, Meyer and Marrakech) or by *C. micrantha* (see lime progenies) (Fig. 8). However, bergamottin and the phototoxic xanthotoxin (53) from Micrantha are maintained in some limes, and citrons bring other phototoxic compounds to their descendants such as heraclenin and heraclenol (51,54), which are absent in pummelos and Micrantha (Fig. 8). Acidic mandarins might be a solution

!

to prevent the transmission of heraclenin and heraclenol from citrons because among the 4 *C. reticulata* × *C. medica* lemon hybrids investigated (Rough, Rangpur, Yellow Rangpur and Volkamer), only the Volkamer lemon produces these 2 compounds (Fig. 8). Alternatively, citrons can also bring the phototoxic limettin and oxypeucedanin hydrate (51) to lemons (see Eureka, Meyer and Marrakech lemons progenies), 2 chemical compounds absent in sour oranges (Fig. 8). This problem cannot be solved by the use of mandarins as the parental line (see Rough, Rangpur and Volkamer lemons progenies) because they all contain limettin and sometimes oxypeucedanin hydrate (Fig. 8).

In conclusion, this study highlights the different chemotypes found in *Citrus* species regarding coumarin and furanocoumarin diversity and content. Three of 4 ancestral taxa (pummelos, citrons and papedas) synthesize high amounts of these compounds, whereas mandarins, from the last ancestral taxon, appear practically devoid of them. As for hybrid species, their corresponding chemotypes appear inherited from the 4 ancestral taxa, with strong hypotheses of a prevalence of pummelos, citrons and papedas over mandarins and of papedas over citrons. Compared to other species, mandarins are of invaluable interest for *Citrus* breeding programs aimed at removing toxic furanocoumarins in *Citrus*. Particularly, sweet oranges and small mandarins hybrids, which have a higher contribution of mandarin in their genotype, do not produce the toxic compounds bergamottin, epoxybergamottin and 6',7'-dihydroxybergamottin. An alternative strategy for the future would lie in the identification of an upstream gene involved in the first steps leading to the furanocoumarin pathway. Such gene characterization should allow gene editing strategies to be performed and would constitute an efficient solution for removing these toxic compounds from *Citrus* species.

References

1. Praloran J-C. Citrus. Paris# G.P. Maisonneuve et Larose; 1971. 565 p.
2. Gmitter FG, Chen C, Rao MN, Soneji JR. Citrus Fruits. In: Kole C, editor. Fruits and Nuts [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2007 [cited 2015 Jun 3]. p. 265–79. Available from: http://link.springer.com.bases-doc.univ-lorraine.fr/chapter/10.1007/978-3-540-34533-6_14
3. Nelson DR. Cytochrome P450 homepage [Internet]. 2015 [cited 2015 Apr 27]. Available from: http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html
4. Groppo M, Pirani JR, Salatino MLF, Blanco SR, Kallunki JA. Phylogeny of Rutaceae based on twononcoding regions from cpDNA. Am J Bot. 2008;95(8):985–1005.
5. Swingle W, Reece P. The botany of Citrus and its wild relatives. In: Reuther W, Webber H, Batchelor L, editors. The citrus industry. Berkeley, CA: University of California; 1967. p. 190–430.
6. Tanaka T. Fundamental discussion of Citrus classification. Stud Citrol. 1977;14:1–6.
7. Federici CT, Fang DQ, Scora RW, Roose ML. Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. Theor Appl Genet. 1998;96(6-7):812–22.
8. Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, Malfa SL, Continella G, Tribulato E. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. Theor Appl Genet. 2000;100(8):1155–66.

!

9. Barkley NA, Roose ML, Krueger RR, Federici CT. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). Theor Appl Genet. 2006;112(8):1519–31.
10. Froelicher Y, Mouhaya W, Bassene J-B, Costantino G, Kamiri M, Luro F, et al. New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. Tree Genet Genomes. 2011;7(1):49–61.
11. Ollitrault P, Terol J, Garcia-Lor A, Bérard A, Chauveau A, Froelicher Y, et al. SNP mining in C. clementina BAC end sequences; transferability in the Citrus genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping. BMC Genomics. 2012;13:13.
12. Garcia-Lor A, Curk F, Snoussi-Trifa H, Morillon R, Ancillo G, Luro F, et al. A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the "true citrus fruit trees" group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. Ann Bot. 2013;111(1):1–19.
13. Wu GA, Prochnik S, Jenkins J, Salse J, Hellsten U, Murat F, et al. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. Nat Biotechnol. 2014;32(7):656–62.
14. Curk F, Ancillo G, Ollitrault F, Perrier X, Jacquemoud-Collet J-P, Garcia-Lor A, et al. Nuclear species-diagnostic SNP markers mined from 454 amplicon sequencing reveal admixture genomic structure of modern citrus varieties. PloS One. 2015;10(5):e0125628.
15. Carbonell-Caballero J, Alonso R, Ibañez V, Terol J, Talon M, Dopazo J. A Phylogenetic Analysis of 34 Chloroplast Genomes Elucidates the Relationships between Wild and Domestic Species within the Genus Citrus. Mol Biol Evol. 2015;
16. Bourgaud F, Hehn A, Larbat R, Doerper S, Gontier E, Kellner S, et al. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. Phytochem Rev. 2006;5(2-3):293–308.
17. Berenbaum MR, Nitao JK, Zangerl AR. Adaptive significance of furanocoumarin diversity in Pastinaca sativa (Apiaceae). J Chem Ecol. 1991;17(1):207–15.
18. Robl M, Robl R, Marinoni LP, Abagge KT, Carvalho VO. Assemble the puzzle: bizarre-looking lesions. Arch Child. 2013;98(11):915.
19. Calka O, Akdeniz N, Metin A, Behcet L. Phototoxic dermatitis due to Chenopodium album in a mother and son. Contact Dermatitis. 2005;53(1):58–60.
20. Messer A, Raquet N, Lohr C, Schrenk D. Major furocoumarins in grapefruit juice II: phototoxicity, photogenotoxicity, and inhibitory potency vs. cytochrome P450 3A4 activity. Food Chem Toxicol. 2012;50(3-4):756–60.
21. Ohta T, Maruyama T, Nagahashi M, Miyamoto Y, Hosoi S, Kiuchi F, et al. Paradisin C: a new CYP3A4 inhibitor from grapefruit juice. Tetrahedron. 2002;58(33):6631–5.
22. Gravot A, Larbat R, Hehn A, Lièvre K, Gontier E, Goergen J-L, et al. Cinnamic acid 4-hydroxylase mechanism-based inactivation by psoralen derivatives: cloning and characterization of a C4H from a psoralen producing plant _Ruta graveolens_ exhibiting low sensitivity to psoralen inactivation. Arch Biochem Biophys. 2004;422(1):71–80.
23. Lin H, Kenaan C, Hollenberg PF. Identification of the residue in Human CYP3A4 that is covalently modified by bergamottin and the reactive intermediate that contributes to the grapefruit juice effect. Drug Metab Dispos. 2012;40(5):998–1006.
24. Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. N Engl J Med. 2005;352(21):2211–21.

!

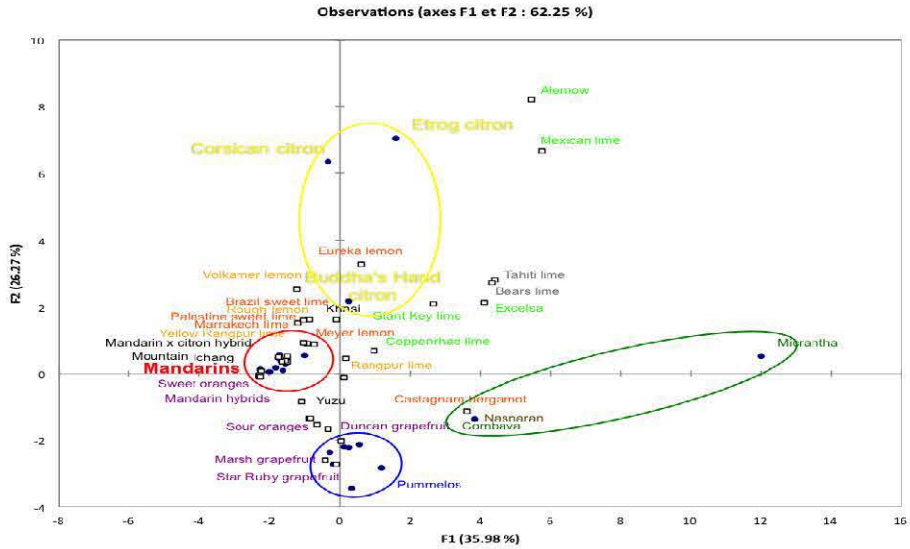
25. Bailey DG, Dresser G, Arnold JM. Grapefruit-medication interactions: forbidden fruit or avoidable consequences? Can Med Assoc J. 2013;185(4):309–16.
26. Bailey DG, Spence JD, Munoz C, Arnold JM. Interaction of citrus juices with felodipine and nifedipine. Lancet. 1991;337(8736):268–9.
27. UNCTAD. Citrus consumption [Internet]. 2011. Available from: http://www.unctad.info/en/Infocomm/
28. Liu Y, Heying E, Tanumihardjo SA. History, global distribution, and nutritional importance of Citrus fruits. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2012;11(6):530–45.
29. Hwang S-L, Shih P-H, Yen G-C. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. J Agric Food Chem. 2012;60(4):877–85.
30. Buscemi S, Rosafio G, Arcoleo G, Mattina A, Canino B, Montana M, et al. Effects of red orange juice intake on endothelial function and inflammatory markers in adult subjects with increased cardiovascular risk. Am J Clin Nutr. 2012;95(5):1089–95.
31. Paine MF, Criss AB, Watkins PB. Two major grapefruit juice components differ in time to onset of intestinal CYP3A4 inhibition. J Pharmacol Exp Ther. 2005;312(3):1151–60.
32. Uesawa Y, Mohri K. The use of heat treatment to eliminate drug interactions due to grapefruit juice. Biol Pharm Bull. 2006;29(11):2274–8.
33. Uesawa Y, Mohri K. UV-irradiated grapefruit juice loses pharmacokinetic interaction with nifedipine in rats. Biol Pharm Bull. 2006;29(6):1286–9.
34. Myung K, Narciso JA, Manthey JA. Removal of furanocoumarins in grapefruit juice by edible fungi. J Agric Food Chem. 2008;56(24):12064–8.
35. Larbat R, Kellner S, Specker S, Hehn A, Gontier E, Hans J, et al. Molecular cloning and functional characterization of psoralen synthase, the first committed monooxygenase of furanocoumarin biosynthesis. J Biol Chem. 2007;282(1):542–54.
36. Larbat R, Hehn A, Hans J, Schneider S, Jugde H, Schneider B, et al. Isolation and functional characterization of CYP71AJ4 encoding for the first P450 monooxygenase of angular furanocoumarin biosynthesis. J Biol Chem. 2009;284(8):4776–85.
37. Vialart G, Hehn A, Olry A, Ito K, Krieger C, Larbat R, et al. A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from Ruta graveolens L. exhibits p-coumaroyl CoA 2'-hydroxylase activity (C2'H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants. Plant J. 2012;70(3):460–70.
38. Karamat F, Olry A, Munakata R, Koeduka T, Sugiyama A, Paris C, et al. A coumarin-specific prenyltransferase catalyzes the crucial biosynthetic reaction for furanocoumarin formation in parsley. Plant J Cell Mol Biol. 2014;77(4):627–38.
39. Dugrand A, Olry A, Duval T, Hehn A, Froelicher Y, Bourgaud F. Coumarin and furanocoumarin quantitation in citrus peel via ultraperformance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS). J Agric Food Chem. 2013;61(45):10677–84.
40. Vandermolen KM, Cech NB, Paine MF, Oberlies NH. Rapid quantitation of furanocoumarins and flavonoids in grapefruit juice using ultra-performance liquid chromatography. Phytochem Anal. 2013;24(6):654–60.
41. Durand-Hulak M, Dugrand A, Duval T, Bidel LPR, Jay-Allemand C, Froelicher Y, et al. Mapping the genetic and tissular diversity of 64 phenolic compounds in Citrus species using a UPLC-MS approach. Ann Bot. 2015;115(5):861–77.
42. Xu J, Ma L, Jiang D, Zhu S, Yan F, Xie Y, et al. Content evaluation of 4 furanocoumarin monomers in various citrus germplasms. Food Chem. 2015;187:75 81.

!

43. Voo SS, Grimes HD, Lange BM. Assessing the biosynthetic capabilities of secretory glands in Citrus peel. Plant Physiol. 2012;159(1):81–94.
44. Sasaki K, Mito K, Ohara K, Yamamoto H, Yazaki K. Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of Sophora flavescens. Plant Physiol. 2008;146(3):1075–84.
45. Sasaki K, Tsurumaru Y, Yamamoto H, Yazaki K. Molecular characterization of a membrane-bound prenyltransferase specific for isoflavone from Sophora flavescens. J Biol Chem. 2011;286(27):24125–34.
46. Munakata R, Inoue T, Koeduka T, Karamat F, Olry A, Sugiyama A, et al. Molecular cloning and characterization of a geranyl diphosphate-specific aromatic prenyltransferase from lemon. Plant Physiol. 2014;166(1):80–90.
47. Li H, Ban Z, Qin H, Ma L, King AJ, Wang G. A heteromeric membrane-bound prenyltransferase complex from hop catalyzes three sequential aromatic prenylations in the bitter acid pathway. Plant Physiol. 2015;167(3):650–9.
48. Bourgaud F, Brunel M, Guckert A, Forlot P. Effect of nitrogen nutrition and environmental conditions on the production of pharmaceutically useful metabolites by Psoralea cinerea. Eur J Agron. 1992;1(1):37–43.
49. Curk F. Citrus gene pool organization and nuclear genomic interspecific admixture of cultivated citrus. [Corsica, France]; 2014.
50. Fujita T, Kawase A, Niwa T, Tomohiro N, Masuda M, Matsuda H, et al. Comparative evaluation of 12 immature citrus fruit extracts for the inhibition of cytochrome P450 isoform activities. Biol Pharm Bull. 2008;31(5):925–30.
51. Raquet N, Schrenk D. Application of the equivalency factor concept to the phototoxicity and -genotoxicity of furocoumarin mixtures. Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc. 2014;68:257–66.
52. Wangensteen H, Molden E, Christensen H, Malterud KE. Identification of epoxybergamottin as a CYP3A4 inhibitor in grapefruit peel. Eur J Clin Pharmacol. 2003;58(10):663–8.
53. Pathak MA, Fellman JH, Kaufman KD. The effect of structural alterations on the erythemal activity of furocoumarins: psoralens. J Invest Dermatol. 1960;35:165–83.
54. Colombain M, Goll V, Muyard F, Girard C, Bévalot F, Richert L. A bioassay using the human hepatoblastoma cell line HepG2 for detecting phototoxicity of furocoumarins. Planta Med. 2001;67(7):644–6.

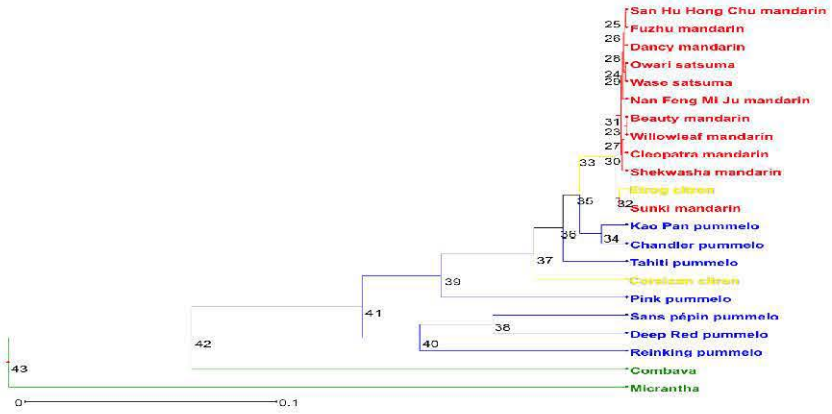
!

Supporting information



S1 Fig. PCA representation of the 61 citrus varieties based on the coumarins and furanocoumarins contents in peel expressed as mg.kg^{-1} fresh weight. Ancestral taxa were used as active individuals (circles) to build the PCA, while secondary species are supplementary individuals (squares). Quantitative data were transformed as $\log_{10}(1 + x)$. The colors correspond to the phylogenetic constitution of the varieties and are indicated in Figs. 2 and 3.

!



S2 Fig. NJ analysis of the 23 citrus varieties belonging to the 4 ancestral taxa based on the coumarins and furanocoumarins contents in pulp expressed as mg.kg^{-1} fresh weight. Numbers in black represent the bootstrap probability values. The colors correspond to the phylogenetic constitution of the varieties and are indicated in Figs. 2 and 3.

'

! S1 Table. List of the 61 citrus species investigated in the study and their phylogenetic constitution.

Horticultural group	Common name of ancestral species	SRA number	Swingle's classification system	Tanaka's classification system	Phylogenetic constitution	References
Papeda	Micrantha	-	*C. micrantha* Wester	*C. micrantha* Wester	*C. micrantha*	(8, 10, 12, 14)
	Combava	630	*C. hystrix* D.C.	*C. hystrix* D.C.	*C. micrantha*	
Citron	Corsican citron	613	*C. medica* L.	*C. medica* L.	*C. medica*	(8, 10, 12, 14)
	Etrog citron	709	*C. medica* L.	*C. medica* L.	*C. medica*	
	Buddha's Hand citron	640	*C. medica* L.	*C. medica* L.	*C. medica*	
Pummelo	Deep Red pummelo	757	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima*	(8, 10, 12, 14)
	Reinking pummelo	323	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima*	
	Tahiti pummelo	727	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima*	
	Chandler pummelo	608	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima*	
	Sene pépin pummelo	710	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima*	
	Kao Pan pummelo	321	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima*	
	Pink pummelo	322	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima* (Burm.) Merr.	*C. maxima*	
Mandarin	Willowleaf mandarin	133	*C. reticulata* Blanco	*C. deliciosa* Ten.	*C. reticulata*	(8, 10, 12, 14)
	Fuzhu mandarin	599	*C. reticulata* Blanco	*C. erythrosa* Hort. ex Tan.	*C. reticulata*	
	San Hu Hong Chu mandarin	789	*C. reticulata* Blanco	*C. erythrosa* Hort. ex Tan.	*C. reticulata*	
	Nan Feng MI Ju mandarin	839	*C. reticulata* Blanco	*C. Kinokuni* Hort. ex Tan.	*C. reticulata*	
	Beauty mandarin	261	*C. reticulata* Blanco	*C. reticulata* Blanco	*C. reticulata*	
	Dancy mandarin	552	*C. reticulata* Blanco	*C. tangerina* Hort. ex Tan.	*C. reticulata*	
	Wase setsuma	230	*C. reticulata* Blanco	*C. unshiu* Maro.	*C. reticulata*	
	Owari setsuma	221	*C. reticulata* Blanco	*C. unshiu* Maro.	*C. reticulata*	
	Sunki mandarin	705	*C. reticulata* Blanco var. austera Swing.	*C. sunki* (Hayata) Hort. ex Tan.	*C. reticulata* var austera	
	Shekwasha mandarin	982	*C. reticulata* Blanco hybrid	*C. depressa* Hayata	*C. reticulata* var austera	
	Cleopatra mandarin	948	*C. reticulata* Blanco var. austera Swing.	*C. reshni* Hort. ex Tan.	*C. reticulata* var austera	
Horticultural group	**Common name of secondary species**	**SRA number**	**Swingle's classification system**	**Tanaka's classification system**	**Phylogenetic constitution**	
Small mandarin hybrid	Commune Clementine	92	*C. reticulata* × *C. sinensis*	*C. clementina* Hort.ex Tan.	*C. reticulata* x ((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*)	(49)
	Murcott tangor	601	*C. reticulata* × *C. sinensis* ?	*C. reticulata* × *C. sinensis* ?	*C. reticulata* x ((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*) ?	
	Bendiguangju	578	*C. reticulata* Blanco	*C. nobilis* Lour.	?	-
	Fortune mandarin	31	(*C. reticulata* × *C. sinensis*) × *C. tangerina*	*C. clementina* × *C. tangerina*	((*C. reticulata* x ((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*))) x (*C. reticulata* x (*C. maxima* x ((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*)))	(49)
Sweet orange	Washington Navel sweet orange	217	*C. sinensis* (L.) Osbeck	*C. sinensis* (L.) Osbeck	(*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*	(8, 12, 14, 49)
	Shamouti sweet orange	299	*C. sinensis* (L.) Osbeck	*C. sinensis* (L.) Osbeck	(*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*	
	Hamlin sweet orange	41	*C. sinensis* (L.) Osbeck	*C. sinensis* (L.) Osbeck	(*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*	
	Pineapple sweet orange	42	*C. sinensis* (L.) Osbeck	*C. sinensis* (L.) Osbeck	(*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*	
Grapefruit	Duncan grapefruit	470	*C. paradisi* Macf.	*C. paradisi* Macf.	*C. maxima* x ((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*)	(8, 12, 14, 49)
	Marsh grapefruit	284	*C. paradisi* Macf.	*C. paradisi* Macf.	*C. maxima* x ((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*)	
	Star Ruby grapefruit	293	*C. paradisi* Macf.	*C. paradisi* Macf.	*C. maxima* x ((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. reticulata*)	
Sour orange	Marco sour orange	122	*C. aurantium* L.	*C. aurantium* L.	*C. maxima* x *C. reticulata*	(8, 12, 14, 49)
	Bouquetier de Nice sour orange	952	*C. aurantium* L.	*C. aurantium* L.	*C. maxima* x *C. reticulata*	
	Granito sour orange	870	*C. aurantium* L.	*C. aurantium* L.	*C. maxima* x *C. reticulata*	
	Chinotto sour orange	752	*C. aurantium* L.	*C. myrtifolia* Raf.	*C. maxima* x *C. reticulata*	
Lemon	Eureka lemon	2	*C. limon* (L.) Burm. f.	*C. limon* (L.) Burm. f.	(*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. medica*	(48)
	Meyer lemon	292	*C. limon* (L.) Burm. f.	*C. limon* (L.) Burm. f.	(*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. medica* or ((*C. maxima* x *C. reticulata*)x *C. reticulata*) x *C. medica*	
	Rough lemon	778	*C. limon* (L.) Burm. f.	*C. jambhiri* Lush.	*C. reticulata* x *C. medica*	
	Volkamer lemon	729	*C. limon* (L.) Burm. f.	*C. limonia* Osbeck	*C. reticulata* x *C. medica*	
	Marrakech lime	826	*C. limon* (L.) Burm. f.	*C. limetta* Risso	(*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. medica*	
	Rangpur lime	110050	*C. limon* (L.) Burm. f.	*C. limonia* Osbeck	*C. reticulata* x *C. medica*	
	Yellow Rangpur lime	944	*C. limon* (L.) Burm. f.	*C. limonia* Osbeck	*C. reticulata* x *C. medica*	
Lime	Mexican lime	140	*C. aurantiifolia* (Christm.) Swing.	*C. aurantiifolia* (Christm.) Swing.	*C. micrantha* x *C. medica*	(14)
	Giant Key lime	785	*C. aurantiifolia* (Christm.) Swing.	*C. aurantiifolia* (Christm.) Swing.	*C. micrantha* x *C. medica*	
	Coppenhead lime	838	*C. aurantiifolia* (Christm.) Swing.	*C. aurantiifolia* (Christm.) Swing.	2 (*C. micrantha* x *C. medica*) x *C. medica*	(48)
	Excelsa	110234	*C. aurantiifolia* (Christm.) Swing.	*C. excelsa* Wester	*C. micrantha* x *C. medica*	(14)
	Tahiti lime	58	*C. aurantiifolia* (Christm.) Swing.	*C. latifolia* (Yu. Tan.) Tan.	((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. medica*) x 2 (*C. micrantha* x *C. medica*)	(48)
	Bears lime	616	*C. aurantiifolia* (Christm.) Swing.	*C. latifolia* (Yu. Tan.) Tan.	((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. medica*) x 2 (*C. micrantha* x *C. medica*)	
	Brazil sweet lime	687	*C. aurantiifolia* (Christm.) Swing.	*C. limettoides* Tan.	(*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. medica*	(14, 48)
	Palestine sweet lime	802	*C. aurantiifolia* (Christm.) Swing.	*C. limettoides* Tan.	(*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. medica*	
	Alemow	779	*C. aurantiifolia* (Christm.) Swing.	*C. macrophylla* Wester	*C. micrantha* x *C. medica*	(14)
Bergamot	Castagnero Bergamot	812	*C. aurantiifolia* var Bergamia	*C. bergamia* Risso and Poit.	((*C. maxima* x *C. reticulata*) x *C. medica*) x (*C. maxima* x *C. reticulata*)	(48)
Amblycarpa	Nasnaran mandarin	896	*C. reticulata* Blanco hybrid	*C. amblycarpa* (Hassk.) Ochse.	*C. micrantha* x *C. reticulata*	(14)
Mandarin × citron hybrid	Mandarin × citron hybrid	1057	*C. reticulata* Blanco var. austera Swing. x *C. medica* L.	*C. reticulata* Blanco var. austera Swing. x *C. medica* L.	*C. reticulata* x *C. medica*	(48)
Ichang	Ichang	687	*C. ichangensis* Swing.	*C. ichangensis* Swing.	?	-
Hellmi	Mountain	110302	*C. hellsii* B.C. Stone (Tan. Class.)	*C. hellsii* B.C. Stone	?	-
Yuzu	Yuzu	548	*C. ichang austera* ex. Tan. hybrid	*C. junos* Siebold	?	-
Latipes	Khasi	844	*C. latipes* (Swing.) Tan.	*C. latipes* (Swing.) Tan.	?	-

	Limit of detection (mg/kg)	Limit of quantitation (mg/kg)	Specificity	
			Equation	r^2
Coumarins				
Umbelliferone	0,01	0,03	-	-
Orthol	0,00	0,01	-	-
Aurapten	0,01	0,03	y = 0,0008 x	0,9969
Epoxyaurapten	0,09	0,30	-	-
Limettin	0,01	0,02	-	-
5-geranyloxy-7-methoxycoumarin	0,00	0,01	-	-
Furanocoumarins				
Psoralen	0,01	0,03	-	-
Bergaptol	0,13	0,43	-	-
Bergapten	0,02	0,06	y = 0,0067 x	0,9990
Isoimperatorin	0,09	0,29	-	-
Oxypencedanin	0,02	0,05	y = 0,0056 x	0,9989
Oxypencedanin hydrate	0,01	0,04	y = 0,0658 x	0,9951
Bergamottin	0,01	0,02	-	-
Epoxybergamottin	0,04	0,12	-	-
6',7'-dihydroxybergamottin	0,62	2,06	-	-
Xanthotoxol	0,01	0,04	-	-
Xanthotoxin	0,01	0,03	-	-
Imperatorin	0,05	0,17	-	-
Heraclenin	0,05	0,15	-	-
Heraclenol	0,08	0,28	-	-
8-geranyloxypsoralen	0,32	1,07	y = 0,0935 x	0,9959
Isopimpinellin	0,02	0,08	y = 0,0168 x	0,9919
Phellopterin	0,17	0,57	-	-
Byakangelicol	0,01	0,02	-	-
Byakangelicin	1,28	4,26	-	-
Cnidilin	0,02	0,08	-	-
Cnidicin	0,31	1,03	-	-

S2 Table. Limits of detection and quantitation of the coumarins and furanocoumarins in the citrus pulp and specificity (equation and coefficient of determination, r^2) of the UPLC-MS method.

S3 Tables

		Deep Red pummelo		Reinking pummelo		Tahiti pummelo		Chandler pummelo	
		Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Coumarins								
	Umbelliferone								
	Osthol	16.66 ± 3.83	0.18 ± 0.08	8.92 ± 3.27	Traces	22.18 ± 9.81	Traces	1.46 ± 0.39	Traces
	Aurapten	7.15 ± 0.47	2.98 ± 1.31	15.17 ± 7.62	1.46 ± 0.68	16.87 ± 4.29	Traces	39.34 ± 15.12	2.12 ± 0.88
	Epoxyaurapten	21.99 ± 2.50		60.34 ± 8.17		133.19 ± 25.75	Traces	10.45 ± 1.46	
	Limettin			2.86 ± 0.45		2.56 ± 0.79	2.79 ± 0.86	1.96 ± 0.12	Traces
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin			Detected		Detected			
	Furanocoumarins								
	Psoralen				Traces				
Bergapten cluster	Bergaptol		Traces					13.83 ± 2.11	Traces
	Bergapten						Traces	26.80 ± 7.28	Traces
	Isoimperatorin	27.95 ± 8.41	132.66 ± 40.93	74.66 ± 33.80	26.26 ± 8.22	Traces	Traces		Traces
	Oxypeucedanin	31.22 ± 10.29	4.96 ± 2.58	34.12 ± 5.54	17.02 ± 8.95	0.68 ± 0.16	0.77 ± 0.28	0.90 ± 0.12	0.59 ± 0.07
	Oxypeucedanin hydrate	9.98 ± 0.67	21.74 ± 7.52	9.51 ± 2.77	25.67 ± 3.63				
	Bergamottin	0.24 ± 0.05	0.46 ± 0.19	3.24 ± 1.03	Traces	14.66 ± 6.76	2.62 ± 1.83	1.48 ± 0.75	12.33 ± 5.67
	Epoxybergamottin	9.31 ± 3.00		82.41 ± 37.55	Traces	77.31 ± 20.18	21.03 ± 9.58	10.76 ± 1.19	5.28 ± 1.06
	6',7'-dihydroxybergamottin	13.36 ± 3.07	19.45 ± 7.01	34.55 ± 10.84	6.59 ± 2.18	108.56 ± 40.20	24.42 ± 12.07	60.27 ± 4.52	38.14 ± 6.77
Xanthotoxin cluster	Xanthotoxol								
	Xanthotoxin								
	Imperatorin	Traces	10.38 ± 1.08	Traces	21.33 ± 1.48				
	Heraclenin								
	Heraclenol								
	8-geranyloxypsoralen	1.47 ± 0.05	2.43 ± 0.75	4.02 ± 0.95	Traces	15.29 ± 8.18	Traces	2.59 ± 0.63	2.52 ± 0.96
Isopimpinellin cluster	Isopimpinellin			Traces	Traces	Traces	Traces	0.54 ± 0.05	Traces
	Phellopterin		3.26 ± 0.67		Traces				
	Byakangelicol	0.65 ± 0.19							
	Byakangelicin								
	Cnidilin		0.71 ± 0.15		Traces				
	Cnidicin	9.20 ± 2.14	24.46 ± 5.30	14.17 ± 1.94	9.63 ± 4.25				
	TOTAL (mg.kg^{-1})	149.18	223.67	343.97	107.96	391.30	51.63	170.38	60.98

		Sans pépin pummelo		Kao Pan pummelo		Pink pummelo	
		Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Coumarins						
	Umbelliferone		Traces				
	Osthol	27.84 ± 8.70	0.19 ± 0.06	1.69 ± 0.63	Traces	20.69 ± 6.25	Traces
	Aurapten	11.28 ± 4.91	0.36 ± 0.12	33.46 ± 9.80	0.69 ± 0.16	41.92 ± 16.85	9.09 ± 4.04
	Epoxyaurapten	11.99 ± 2.77		39.78 ± 9.29		32.20 ± 14.87	
	Limettin	1.68 ± 0.48	Traces	1.62 ± 0.30		1.96 ± 0.57	
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin	Detected					
	Furanocoumarins						
	Psoralen						
Bergapten cluster	Bergaptol		2.38 ± 0.68				Traces
	Bergapten			20.58 ± 3.58		22.91 ± 2.58	12.09 ± 2.19
	Isoimperatorin	67.61 ± 13.52	88.39 ± 51.26				Traces
	Oxypeucedanin	37.38 ± 6.62	5.08 ± 1.42	Traces	0.33 ± 0.07	Traces	0.60 ± 0.13
	Oxypeucedanin hydrate	11.68 ± 5.08	4.50 ± 1.71				1.46 ± 0.65
	Bergamottin	0.20 ± 0.09	0.09 ± 0.04	0.58 ± 0.20	6.77 ± 2.64	2.55 ± 0.88	17.89 ± 8.11
	Epoxybergamottin	11.30 ± 5.80	Traces	51.57 ± 17.58	Traces	17.35 ± 2.85	Traces
	6',7'-dihydroxybergamottin	18.34 ± 8.02	5.61 ± 2.05	56.03 ± 22.27	34.41 ± 12.23	50.40 ± 8.55	149.97 ± 68.00
Xanthotoxin cluster	Xanthotoxol						
	Xanthotoxin						
	Imperatorin		4.71 ± 2.09				
	Heraclenin						
	Heraclenol						
	8-geranyloxypsoralen		Traces	2.40 ± 0.64		1.75 ± 0.29	3.52 ± 0.70
Isopimpinellin cluster	Isopimpinellin		Traces	Traces		Traces	Traces
	Phellopterin						
	Byakangelicol						
	Byakangelicin						
	Cnidilin		Traces				
	Cnidicin		12.53 ± 2.41				
	TOTAL (mg.kg^{-1})	199.30	123.84	207.71	42.20	191.73	194.62

!

Tables A. Concentration (in mg.kg-1 fresh weight ± standard deviation) of the coumarins and the furanocoumarins in the pummelos peel and pulp extracts. The mention « Traces » is used for compounds that could be detected but not quantitated (3 < S/N < 10) while « Detected » is used when 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin was identified in the samples.!

		Corsican citron		Etrog citron		Buddha's Hand citron	
		Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Coumarins						
	Umbelliferone		0.20 ± 0.01				
	Osthol						
	Aurapten	0.56 ± 0.08	0.40 ± 0.15	0.49 ± 0.11	0.36 ± 0.07	0.68 ± 0.21	
	Epoxyaurapten						
	Limettin	3.92 ± 0.54	0.66 ± 0.09	198.95 ± 20.55	1.33 ± 0.09	152.25 ± 24.24	
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin	Detected	Detected	Detected	Detected	Detected	
	Furanocoumarins						
	Psoralen						
Bergaptan-like	Bergaptol						
	Bergapten	2.57 ± 0.44	0.35 ± 0.02	8.83 ± 2.30	0.85 ± 0.18	6.54 ± 0.83	
	Isoimperatorin	0.96 ± 0.09	Traces	4.44 ± 0.87	Traces	3.09 ± 0.81	
	Oxypeucedanin	1.32 ± 0.22	0.42 ± 0.02	40.84 ± 9.30	0.19 ± 0.00	13.83 ± 3.67	
	Oxypeucedanin hydrate	0.48 ± 0.08	0.21 ± 0.05	16.47 ± 3.72	0.16 ± 0.01	6.18 ± 0.64	
	Bergamottin						
	Epoxybergamottin						
	8',7'-dihydroxybergamottin						
Xanthotoxin-like	Xanthotoxol						
	Xanthotoxin						
	Imperatorin	3.95 ± 0.96	0.26 ± 0.06	2.98 ± 0.89	0.21 ± 0.02	Traces	
	Heraclenin	18.79 ± 2.68	0.21 ± 0.05	4.15 ± 1.57	Traces	0.66 ± 0.15	
	Heraclenol	7.23 ± 1.40		7.44 ± 1.20		Traces	
	8-geranyloxypsoralen						
Isopimpinellin-like	Isopimpinellin	1.78 ± 0.16	0.33 ± 0.03	5.30 ± 0.50	0.68 ± 0.05	6.66 ± 0.51	
	Phellopterin	5.10 ± 0.75	Traces	15.91 ± 2.67		1.94 ± 0.15	
	Byakangelicol	13.33 ± 2.85	0.06 ± 0.01	34.86 ± 9.17		10.11 ± 1.21	
	Byakangelicin	22.40 ± 5.92		29.38 ± 12.05		Traces	
	Cnidilin						
	Cnidicin	Traces		5.10 ± 1.22		Traces	
	TOTAL (mg.kg^{-1})	82.39	3.10	375.14	3.78	201.94	

Table B. Concentration (in mg.kg-1 fresh weight ± standard deviation) of the coumarins and the furanocoumarins in the citrons peel and pulp extracts. The mention « Traces » is used for compounds that could be detected but not quantitated ($3 < S/N < 10$) while « Detected » is used when 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin was identified in the samples. No data could be obtained for the pulp of Buddha's hand citron as the fruits of this citrus species did not contain pulp.!

		Micrantha		Combava		Ichang papeda	
		Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Coumarins						
	Umbelliferone						
	Osthol						
	Auraptен	4.03 ± 1.43	1.66 ± 0.49	1.00 ± 0.09	0.52 ± 0.10	1.45 ± 0.65	1.57 ± 0.85
	Epoxyauraptен						
	Limettin	2.93 ± 0.42	2.27 ± 0.43	14.39 ± 3.52	4.92 ± 0.43	11.16 ± 2.99	2.65 ± 0.38
	5-gemanyloxy-7-methoxycoumarin	Detected	Detected	Detected	Detected		Detected
	Furanocoumarins						
	Psoralen			Traces	0.19 ± 0.02		
Bergaptol-like	Bergaptol	21.54 ± 10.22	13.31 ± 3.06	25.85 ± 8.59	57.98 ± 2.64		
	Bergapten	728.32 ± 165.98	32.41 ± 8.06	17.28 ± 4.12	4.80 ± 0.64	7.58 ± 1.81	1.53 ± 0.53
	Isoimperatorin	21.61 ± 3.43	1.46 ± 0.41	18.36 ± 3.61	3.65 ± 0.53		
	Oxypeucedanin	274.97 ± 93.72	6.19 ± 1.87	895.14 ± 85.03	16.97 ± 1.39	Traces	0.31 ± 0.07
	Oxypeucedanin hydrate	71.52 ± 11.68	19.40 ± 7.38	107.49 ± 14.01	95.12 ± 14.69		
	Bergamottin	47.23 ± 10.57	28.49 ± 11.65	23.07 ± 3.19	29.40 ± 1.92	Traces	0.28 ± 0.11
	Epoxybergamottin	108.42 ± 44.67	12.43 ± 3.11	485.91 ± 23.72	53.70 ± 7.92		
	6',7'-dihydroxybergamottin	111.39 ± 19.60	28.08 ± 10.60	314.38 ± 51.12	82.63 ± 19.44		
Xanthotoxin-like	Xanthotoxol	4.37 ± 1.52	3.90 ± 1.46				
	Xanthotoxin	32.20 ± 5.28	6.87 ± 2.18	0.47 ± 0.15			
	Imperatorin	Traces					
	Heraclenin						
	Heraclenol						
	8-gemanyloxypsoralen	420.99 ± 195.40	70.78 ± 22.45				
Isopimpinellin-like	Isopimpinellin	894.07 ± 298.76	65.63 ± 19.96	5.33 ± 1.03	2.12 ± 0.47	5.09 ± 0.49	2.09 ± 0.70
	Phellopterin	13.51 ± 2.69	3.90 ± 0.37				
	Byakangelicol	107.27 ± 37.92	5.56 ± 0.95				
	Byakangelicin						
	Cnidilin	113.40 ± 16.07	13.10 ± 4.23				
	Cnidicin						
	TOTAL (mg.kg^{-1})	2777.83	315.44	1908.67	352.06	25.28	8.43

Table C. Concentration (in mg.kg-1 fresh weight ± standard deviation) of the coumarins and the furanocoumarins in the papedas peel and pulp extracts. The mention « Traces » is used for compounds that could be detected but not quantitated (3 < S/N < 10) while « Detected » is used when 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin was identified in the samples.!

		Willowleaf mandarin		Fuzhu mandarin		San Hu Hong Chu mandarin		Nan Feng Mi Ju mandarin	
		Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Coumarins								
	Umbelliferone								
	Osthol								
	Aurapten	Traces		0.31 ± 0.11	0.11 ± 0.02	0.30 ± 0.07	0.14 ± 0.04	1.41 ± 0.24	0.29 ± 0.07
	Epoxyaurapten								
	Limettin	1.18 ± 0.28	0.25 ± 0.06	5.44 ± 1.00	0.59 ± 0.19	3.68 ± 1.70	0.52 ± 0.13	3.17 ± 0.47	0.35 ± 0.02
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin			Detected	Detected	Detected	Detected		
	Furanocoumarins								
	Psoralen								
Bergapten cluster	Bergaptol								
	Bergapten	Traces		4.72 ± 0.77	0.81 ± 0.06	3.74 ± 1.82	0.49 ± 0.07	2.71 ± 0.57	0.30 ± 0.06
	Isoimperatorin								
	Oxypeucedanin	0.36 ± 0.05	0.22 ± 0.05	1.95 ± 0.44	0.20 ± 0.04	1.42 ± 0.64	0.15 ± 0.01	1.15 ± 0.06	0.22 ± 0.02
	Oxypeucedanin hydrate						0.32 ± 0.05	Traces	0.38 ± 0.06
	Bergamottin			0.36 ± 0.14	0.06 ± 0.03		0.07 ± 0.03		
	Epoxybergamottin								
	6',7'-dihydroxybergamottin								
Xanthotoxin cluster	Xanthotoxol								
	Xanthotoxin								
	Imperatorin								
	Heraclenin								
	Heraclenol								
	8-geranyloxypsoralen								
Isopimpinellin cluster	Isopimpinellin	Traces	Traces	2.69 ± 0.32	0.55 ± 0.18	2.11 ± 0.95	0.33 ± 0.03	5.02 ± 0.42	1.88 ± 0.36
	Phellopterin								
	Byakangelicol								
	Byakangelicin								
	Cnidilin		Traces						
	Cnidicin								
	TOTAL (mg.kg^{-1})	1.54	0.47	15.47	2.32	11.25	2.02	13.46	3.42

		Beauty mandarin		Dancy mandarin		Wase Satsuma		Owari Satsuma	
		Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Coumarins								
	Umbelliferone								
	Osthol								
	Aurapten					0.63 ± 0.12	0.26 ± 0.05	0.64 ± 0.07	0.15 ± 0.05
	Epoxyaurapten								
	Limettin	1.53 ± 0.47	0.27 ± 0.13	7.97 ± 0.52	0.53 ± 0.12	2.11 ± 0.25	0.43 ± 0.08	2.93 ± 0.47	0.43 ± 0.15
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin							Detected	
	Furanocoumarins								
	Psoralen								
Bergapten cluster	Bergaptol								
	Bergapten	Traces		4.85 ± 0.40	Traces	2.12 ± 0.30	0.56± 0.06	2.54 ± 0.17	Traces
	Isoimperatorin								
	Oxypeucedanin	0.35 ± 0.09	0.34 ± 0.10	Traces	Traces	0.88 ± 0.13	0.25 ± 0.04	1.06 ± 0.05	0.28 ± 0.04
	Oxypeucedanin hydrate						Traces		Traces
	Bergamottin								
	Epoxybergamottin					Traces	0.80 ± 0.09	2.73 ± 0.52	1.10 ± 0.23
	6',7'-dihydroxybergamottin								
Xanthotoxin cluster	Xanthotoxol								
	Xanthotoxin								
	Imperatorin								
	Heraclenin								
	Heraclenol								
	8-geranyloxypsoralen								
Isopimpinellin cluster	Isopimpinellin	Traces	Traces	2.37 ± 0.13	0.27 ± 0.04	1.10 ± 0.14	0.36 ± 0.03	1.41 ± 0.08	0.34 ± 0.09
	Phellopterin								
	Byakangelicol								
	Byakangelicin								
	Cnidilin		Traces						
	Cnidicin								
	TOTAL (mg.kg^{-1})	1.88	0.61	15.19	0.80	6.84	2.66	11.31	2.30

		Sunki mandarin		Shekwasha mandarin		Cleopatra mandarin	
		Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Coumarins						
	Umbelliferone						
	Osthol						
	Aurapten		Traces	0.73 ± 0.37	0.18 ± 0.05		
	Epoxyaurapten						
	Limettin	5.30 ± 0.20	0.86 ± 0.17	11.23 ± 5.70	Traces	0.55 ± 0.17	Traces
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin					Detected	Detected
	Furanocoumarins						
	Psoralen						
Bergapten cluster	Bergaptol						
	Bergapten	3.86 ± 0.60	0.68 ± 0.05	23.00 ± 11.51	0.80 ± 0.08	0.50 ± 0.14	
	Isoimperatorin						
	Oxypeucedanin	0.61 ± 0.15	0.13 ± 0.01	2.18 ± 1.33		0.79 ± 0.18	0.33 ± 0.04
	Oxypeucedanin hydrate		Traces			0.73 ± 0.31	
	Bergamottin			0.98 ± 0.52	Traces	0.16 ± 0.04	0.14 ± 0.03
	Epoxybergamottin						
	6',7'-dihydroxybergamottin						
Xanthotoxin cluster	Xanthotoxol						
	Xanthotoxin	Traces					
	Imperatorin						
	Heraclenin						
	Heraclenol						
	8-geranyloxypsoralen						
Isopimpinellin cluster	Isopimpinellin	1.52 ± 0.22	0.51 ± 0.03	5.73 ± 3.15	0.66 ± 0.11	0.23 ± 0.08	0.11 ± 0.01
	Phellopterin						
	Byakangelicol						
	Byakangelicin						
	Cnidilin		Traces				
	Cnidicin						
	TOTAL (mg.kg^{-1})	11.29	2.18	43.85	1.64	2.96	0.58

Tables III : Concentration (in mg.kg-1 fresh weight ± standard deviation) of the coumarins and the furanocoumarins in the sweet and acidic mandarins peel and pulp extracts. The mention « Traces » is used for compounds that could be detected but not quantitated (3 < S/N < 10) while « Detected » is used when 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin was identified in the samples.!

		Duncan grapefruit		Marsh grapefruit		Star Ruby grapefruit	
		Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Coumarins						
	Umbelliferone	2.79 ± 0.50		3.38 ± 0.85		2.90 ± 1.16	
	Osthol	3.24 ± 0.47	Traces	3.94 ± 1.25	0.09 ± 0.02	5.13 ± 2.03	0.12 ± 0.04
	Auraptèn	10.89 ± 6.37	2.28 ± 0.31	36.34 ± 15.93	1.66 ± 0.77	38.51 ± 25.07	3.80 ± 1.54
	Epoxyauraptèn	4.69 ± 0.82	2.95 ± 0.39	35.96 ± 9.53	Traces	32.58 ± 8.71	Traces
	Limettin	1.23 ± 0.07		1.08 ± 0.30	Traces	1.71 ± 0.88	0.32 ± 0.09
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin	Detected		Detected		Detected	
	Furanocoumarins						
	Psoralen		0.38 ± 0.04		0.20 ± 0.11		0.27 ± 0.12
Bergaptol-like	Bergaptol	17.73 ± 3.93	8.26 ± 2.27		3.91 ± 1.19		3.74 ± 0.99
	Bergapten	3.10 ± 0.85	Traces	1.13 ± 0.41	Traces	1.54 ± 0.66	1.19 ± 0.22
	Isoimperatorin	Traces	Traces	Traces	Traces		Traces
	Oxypeucedanin	0.71 ± 0.08	0.44 ± 0.04	0.76 ± 0.33	0.29 ± 0.10	0.62 ± 0.24	0.35 ± 0.04
	Oxypeucedanin hydrate						
	Bergamottin	1.87 ± 1.11	28.53 ± 5.40	6.55 ± 1.99	10.46 ± 2.62	12.67 ± 4.03	13.70 ± 4.81
	Epoxybergamottin	4.94 ± 1.16	Traces	25.57 ± 9.09	4.46 ± 1.66	51.55 ± 21.46	3.43 ± 1.22
	6',7'-dihydroxybergamottin	245.64 ± 51.95	175.13 ± 5.50	55.94 ± 15.80	34.21 ± 6.44	68.97 ± 28.28	20.82 ± 7.90
Xanthotoxol-like	Xanthotoxol						
	Xanthotoxin						
	Imperatorin						
	Heraclenin						
	Heraclenol						
	8-geranyloxypsoralen		Traces				
Isopimpinellin-like	Isopimpinellin	0.47 ± 0.05	Traces	0.38 ± 0.08	Traces	0.95 ± 0.21	0.14 ± 0.04
	Phellopterin						
	Byakangelicol						
	Byakangelicin						
	Cnidilin				Traces		
	Cnidicin						
	TOTAL (mg.kg^{-1})	297.30	215.95	171.03	55.28	217.13	47.88

Table E. Concentration (in mg.kg-1 fresh weight ± standard deviation) of the coumarins and the furanocoumarins in the grapefruits peel and pulp extracts. The mention « Traces » is used for compounds that could be detected but not quantitated (3 < S/N < 10) while « Detected » is used when 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin was identified in the samples.!

		Washington Navel sweet orange		Shamouti sweet orange		Hamlin sweet orange		Pineapple sweet orange	
		Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Coumarins								
	Umbelliferone								
	Osthol	traces	0.17 ± 0.01	0.14 ± 0.02	traces	0.22 ± 0.04	0.20 ± 0.05		
	Auraptèn								
	Epoxyauraptèn								
	Limettin	0.32 ± 0.13	traces					0.18 ± 0.71	1.18 ± 0.18
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin								
	Furanocoumarins								
	Psoralen								
Bergaptol-like	Bergaptol								
	Bergapten	Traces						4.28 ± 0.40	
	Isoimperatorin	0.73 ± 0.16	0.63 ± 0.10	0.41 ± 0.07	0.33 ± 0.01	0.53 ± 0.08	0.28 ± 0.03	Traces	Traces
	Oxypeucedanin								
	Oxypeucedanin hydrate								
	Bergamottin								
	Epoxybergamottin								
	6',7'-dihydroxybergamottin								
Xanthotoxol-like	Xanthotoxol								
	Xanthotoxin								
	Imperatorin								
	Heraclenin								
	Heraclenol								
	8-geranyloxypsoralen								
Isopimpinellin-like	Isopimpinellin							2.29 ± 0.58	0.58 ± 0.08
	Phellopterin								
	Byakangelicol								
	Byakangelicin								
	Oxypeucedanin								
	Cnidilin								
	Cnidicin								
	TOTAL (mg.kg^{-1})	1.05	0.80	0.55	0.33	0.75	0.48	12.70	1.76

Table F. Concentration (in mg.kg-1 fresh weight ± standard deviation) of the coumarins and the furanocoumarins in the sweet oranges peel and pulp extracts. The mention « Traces » is used for compounds that could be detected but not quantitated (3 < S/N < 10) while « Detected » is used when 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin was identified in the samples.!

		Maroc sour Orange		Bouquetier de Nice sour orange		Granito sour orange		Chinotto sour orange	
		Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Doussealine								
	Umbelliferone								
	Osthol	14.32 ± 2.33	0.79 ± 0.13	21.22 ± 4.37	1.77 ± 0.32	19.38 ± 2.38	0.38 ± 0.38	11.29 ± 3.34	1.31 ± 0.51
	Auraptén		2.89 ± 0.58		9.97 ± 4.07				3.17 ± 0.48
	Epoxyauraptén								
	Limettin								
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin	Detected	Detected	Detected	Detected	Detected	Detected	Detected	Detected
	Pérarédoussaarins								
	Psoralen		Traces		0.35 ± 0.12		0.18 ± 0.02		Traces
Bergaptène	Bergaptol		4.77 ± 1.42		8.72 ± 1.76		5.87 ± 2.22		
	Bergaptén	17.87 ± 5.77	39.81 ± 14.23	21.75 ± 5.28	107.76 ± 46.02	41.32 ± 2.29	79.08 ± 34.97	16.43 ± 6.30	76.48 ± 20.37
	Isopimpinellin	2.79 ± 0.38		3.86 ± 0.72	Traces	7.66 ± 0.66	Traces	2.61 ± 0.69	Traces
	Oxypeucedanin	0.46 ± 0.12	0.28 ± 0.07	0.60 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.68 ± 0.04	0.70 ± 0.06	0.46 ± 0.06	0.22 ± 0.01
	Oxypeucedanin hydrate								
	Bergamottin	0.35 ± 0.11	1.66 ± 0.42	0.69 ± 0.12	2.06 ± 0.66	1.06 ± 0.23	2.38 ± 0.46	0.63 ± 0.26	0.18 ± 0.11
	Epoxybergamottin	22.06 ± 6.43	7.67 ± 1.19	27.82 ± 8.69	7.32 ± 2.30	48.09 ± 7.84	11.40 ± 2.50	13.29 ± 2.23	
	6',7'-dihydroxybergamottin	13.58 ± 3.76	11.38 ± 4.47	34.71 ± 9.69	25.29 ± 11.28	46.38 ± 4.72	20.38 ± 2.37	38.43 ± 16.76	10.88 ± 2.38
	Xanthotoxol								
Xanthotoxin	Xanthotoxin								
	Imperatorin		Traces		Traces				Traces
	Heraclenin								
	Heraclenol								
	8-geranyloxypsoralen								
	Isopimpinellin	Traces	Traces	Traces	Traces	Traces	Traces	Traces	Traces
	Phellopterin								
	Byakangelicol								
	Byakangelicin								
	Oxypeucedanin								
	Orédéin								
	TOTAL (mg.kg⁻¹)	77.97	69.06	110.64	169.64	186.28	121.91	82.09	91.64

Table G. Concentration (in mg.kg-1 fresh weight ± standard deviation) of the coumarins and the furanocoumarins in the sour oranges peel and pulp extracts. The mention « Traces » is used for compounds that could be detected but not quantitated (3 < S/N < 10) while « Detected » is used when 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin was identified in the samples.!

!

		Commune clementine		Murcott tangor		Bendiguengu		Fortune mandarin	
		Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Doussealine								
	Umbelliferone	0.81 ± 0.19							
	Osthol	0.15 ± 0.03	0.14 ± 0.03					0.29 ± 0.03	
	Auraptén								
	Epoxyauraptén	3.16 ± 0.24	0.42 ± 0.06	Traces				Traces	
	Limettin			Detected	Detected	Detected	Detected	Detected	Detected
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin								
	Pérarédoussaarins								
	Psoralen								
Bergaptène	Bergaptol	3.16 ± 0.27	0.98 ± 0.03						
	Bergaptén								
	Isopimpinellin	0.34 ± 0.13	0.16 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.38 ± 0.09	0.62 ± 0.08	0.58 ± 0.04	0.62 ± 0.08	0.38 ± 0.08
	Oxypeucedanin	0.94 ± 0.27	0.34 ± 0.04						
	Oxypeucedanin hydrate								
	Bergamottin								
	Epoxybergamottin								
	6',7'-dihydroxybergamottin								
	Xanthotoxol								
Xanthotoxin	Xanthotoxin								
	Imperatorin								
	Heraclenin								
	Heraclenol								
	8-geranyloxypsoralen								
	Isopimpinellin	1.40 ± 0.20	0.28 ± 0.01	Traces				Traces	
	Phellopterin								
	Byakangelica								
	Byakangelicin								
	Oxypeucedanin								
	Orédéin								
	TOTAL (mg.kg⁻¹)	10.56	1.71	0.60	0.38	0.62	0.58	0.91	0.38

Table H. Concentration (in mg.kg-1 fresh weight ± standard deviation) of the coumarins and the furanocoumarins in the small mandarin hybrids peel and pulp extracts. The mention « Traces » is used for compounds that could be detected but not quantitated (3 < S/N < 10) while « Detected » is used when 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin was identified in the samples.!

		Eureka lemon		Meyer lemon		Rough lemon		Volkamer lemon	
		Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Coumarins								
	Umbelliferone	Traces							
	Osthol	Traces	Traces	Traces					
	Aurapten					0.91 ± 0.43	0.14 ± 0.03	0.70 ± 0.16	0.23 ± 0.07
	Epoxyaurapten								
	Limettin	24.19 ± 5.24		36.38 ± 0.87	Traces	2.51 ± 0.39	Traces	4.54 ± 1.23	1.15 ± 0.29
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin	Detected	Detected	Detected		Detected	Detected		
	Furanocoumarins								
	Psoralen								
Bergaptol cluster	Bergaptol								
	Bergapten	Traces	Traces	Traces		2.45 ± 0.60	0.71 ± 0.20	2.35 ± 0.24	0.43 ± 0.13
	Isoimperatorin	Traces		4.97 ± 1.41	Traces			1.29 ± 0.22	
	Oxypeucedanin	10.48 ± 3.60	0.28 ± 0.12	17.12 ± 5.22	0.38 ± 0.05	3.08 ± 0.15	0.34 ± 0.09	1.52 ± 0.23	0.24 ± 0.03
	Oxypeucedanin hydrate	21.91 ± 12.56	Traces	2.97 ± 0.69	Traces			1.49 ± 0.55	0.29 ± 0.07
	Bergamottin	2.22 ± 1.30	0.13 ± 0.10			0.63 ± 0.15	0.05 ± 0.02		
	Epoxybergamottin								
	6',7'-dihydroxybergamottin		Traces						Traces
Xanthotoxin cluster	Xanthotoxol								
	Xanthotoxin								
	Imperatorin								
	Heraclenin	1.57 ± 0.86						0.80 ± 0.28	Traces
	Heraclenol	Traces						4.16 ± 1.44	
	8-geranyloxypsoralen	6.75 ± 4.27	Traces						
Isopimpinellin cluster	Isopimpinellin	0.82 ± 0.29		2.73 ± 0.64	Traces	1.92 ± 0.38	0.71 ± 0.24	1.57 ± 0.23	0.63 ± 0.13
	Phellopterin	4.57 ± 2.17							
	Byakangelicol	18.15 ± 7.39		0.92 ± 0.20		2.79 ± 0.63		0.72 ± 0.14	
	Byakangelicin	36.64 ± 16.18				20.91 ± 5.39		14.11 ± 4.53	
	Cnidilin				Traces				
	Cnidicin	Traces							
	TOTAL (mg.kg^{-1})	127.30	0.41	65.09	0.38	35.20	1.95	33.25	2.97

		Marrakech lime		Rangpur lime		Yellow Rangpur lime	
		Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Coumarins						
	Umbelliferone						
	Osthol						
	Aurapten	0.50 ± 0.21		17.90 ± 11.15	0.03 ± 0.00	0.92 ± 0.43	Traces
	Epoxyaurapten	24.46 ± 7.87					
	Limettin	4.40 ± 1.91		47.32 ± 10.17	1.45 ± 0.47	19.44 ± 2.31	1.24 ± 0.16
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin						
	Furanocoumarins						
	Psoralen	0.24 ± 0.05					
Bergaptol cluster	Bergaptol						
	Bergapten	1.40 ± 0.27		5.25 ± 0.73	0.99 ± 0.14	2.51 ± 0.19	0.89 ± 0.21
	Isoimperatorin			2.61 ± 0.65		1.22 ± 0.39	
	Oxypeucedanin	11.38 ± 4.72	0.21 ± 0.04	25.66 ± 7.49	0.13 ± 0.01	10.14 ± 2.29	0.10 ± 0.01
	Oxypeucedanin hydrate	1.72 ± 0.73		19.93 ± 3.20	Traces	2.72 ± 0.72	
	Bergamottin						
	Epoxybergamottin			2.86 ± 0.33		Traces	
	6',7'-dihydroxybergamottin						
Xanthotoxin cluster	Xanthotoxol						
	Xanthotoxin						
	Imperatorin						
	Heraclenin	3.50 ± 1.84					
	Heraclenol	Traces					
	8-geranyloxypsoralen						
Isopimpinellin cluster	Isopimpinellin	0.32 ± 0.10		4.96 ± 0.71	0.49 ± 0.09	3.77 ± 0.56	0.55 ± 0.05
	Phellopterin	Traces		Traces	Traces	Traces	Traces
	Byakangelicol	9.54 ± 2.08		1.80 ± 0.42		2.82 ± 0.15	
	Byakangelicin						
	Cnidilin	Traces		Traces	Traces	Traces	Traces
	Cnidicin						
	TOTAL (mg.kg^{-1})	57.46	0.21	128.29	3.09	43.54	2.78

Tables I. Concentration (in mg.kg-1 fresh weight ± standard deviation) of the coumarins and the furanocoumarins in the lemons peel and pulp extracts. The mention « Traces » is used for compounds that could be detected but not quantitated (3 < S/N < 10) while « Detected » is used when 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin was identified in the samples.!

		Mexican lime		Giant Key lime		Coppenhad lime		Excelsa	
		Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Coumarins								
	Umbelliferone	3.04 ± 1.15	Traces	1.38 ± 0.51	Traces	0.85 ± 0.12	0.49 ± 0.18		0.24 ± 0.02
	Osthol			0.21 ± 0.07	Traces	0.15 ± 0.04	Traces		
	Aurapten	Traces	0.33 ± 0.21	Traces	0.17 ± 0.07	Traces	0.22 ± 0.15	0.61 ± 0.18	0.09 ± 0.02
	Epoxyaurapten	Traces						Traces	
	Limettin	47.74 ± 12.59	1.42 ± 0.22	15.21 ± 5.77	Traces	14.59 ± 6.67	Traces	8.06 ± 0.89	1.10 ± 0.10
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin	Detected	Detected	Detected	Detected	Detected	Detected	Detected	Detected
	Furanocoumarins								
	Psoralen								
Bergapten cluster	Bergaptol				2.17 ± 0.26		0.67 ± 0.27	3.12 ± 1.30	Traces
	Bergapten	6.08 ± 3.11	0.63 ± 0.08	0.70 ± 0.32	0.30 ± 0.08	0.40 ± 0.02	0.15 ± 0.06	4.92 ± 1.00	0.72 ± 0.15
	Isoimperatorin	16.35 ± 3.09	1.11 ± 0.47	1.66 ± 0.72	0.92 ± 0.41	Traces		12.90 ± 4.98	Traces
	Oxypeucedanin	56.89 ± 7.00	0.42 ± 0.11	21.71 ± 5.69	0.44 ± 0.07	16.59 ± 6.56	0.26 ± 0.05	81.05 ± 23.24	0.17 ± 0.03
	Oxypeucedanin hydrate	24.77 ± 9.92	11.95 ± 5.41	4.08 ± 2.12	2.43 ± 1.71	1.86 ± 0.27	Traces	34.81 ± 12.83	0.45 ± 0.20
	Bergamottin	16.05 ± 4.69	15.06 ± 7.70	44.62 ± 9.57	12.99 ± 4.58	23.97 ± 2.82	1.58 ± 1.14	29.04 ± 10.98	0.13 ± 0.06
	Epoxybergamottin	Traces	Traces					117.29 ± 33.15	
	6',7'-dihydroxybergamottin		Traces					37.10 ± 15.27	Traces
Xanthotoxin cluster	Xanthotoxol		6.35 ± 1.05		1.42 ± 0.21		Traces		
	Xanthotoxin	4.84 ± 3.11	0.72 ± 0.43		0.31 ± 0.12			0.20 ± 0.02	
	Imperatorin	5.03 ± 2.01	6.64 ± 1.43	Traces	2.21 ± 0.76			4.33 ± 0.94	
	Heraclenin	33.96 ± 2.75	0.97 ± 0.36	6.42 ± 2.68	0.72 ± 0.34	Traces	Traces	2.02 ± 0.12	Traces
	Heraclenol	7.88 ± 3.71	9.93 ± 4.43		2.04 ± 1.17			Traces	
	8-geranyloxypsoralen	48.08 ± 10.96	13.34 ± 4.74	24.66 ± 10.18	15.09 ± 6.79	16.10 ± 4.38	12.62 ± 7.50	11.55 ± 3.57	Traces
Isopimpinellin cluster	Isopimpinellin	50.76 ± 8.29	3.29 ± 1.46	24.68 ± 7.60	1.36 ± 0.64	1.34 ± 0.15	0.18 ± 0.10	3.09 ± 0.23	0.51 ± 0.08
	Phellopterin	18.85 ± 6.74	1.35 ± 0.21	2.55 ± 0.77	1.29 ± 0.63	1.15 ± 0.33	Traces	10.82 ± 1.82	Traces
	Byakangelicol	73.37 ± 7.21	Traces	23.33 ± 9.00	Traces	10.00 ± 1.87	Traces	41.63 ± 8.43	Traces
	Byakangelicin	Traces	14.43 ± 4.47	Traces	Traces	Traces	Traces		
	Cnidilin	47.71 ± 7.84	2.80 ± 1.22	9.75 ± 3.44	2.09 ± 1.12	2.37 ± 0.97	0.17 ± 0.03		
	Cnidicin	4.83 ± 1.74	1.57 ± 0.41	1.04 ± 0.45	Traces	Traces	Traces	2.64 ± 0.49	
	TOTAL (mg.kg^{-1})	466.23	92.31	182.00	45.95	89.37	16.34	405.18	3.41

		Tahiti lime		Bears lime		Brazil sweet lime		Palestine sweet lime	
		Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Coumarins								
	Umbelliferone					Traces		Traces	
	Osthol							Traces	Traces
	Aurapten	1.17 ± 0.20	0.25 ± 0.08	1.20 ± 0.41	0.30 ± 0.05	Traces		Traces	
	Epoxyaurapten								
	Limettin	359.33 ± 147.68	Traces	140.60 ± 45.93	Traces	25.35 ± 10.13	Traces	29.18 ± 4.70	Traces
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin	Detected	Detected	Detected	Detected	Detected	Detected		Detected
	Furanocoumarins								
	Psoralen	0.33 ± 0.13		Traces					
Bergapten cluster	Bergaptol								
	Bergapten	288.49 ± 30.74	1.71 ± 0.49	173.22 ± 54.20	1.80 ± 1.28	1.26 ± 0.22		Traces	
	Isoimperatorin	1.63 ± 0.33	Traces	3.17 ± 0.69	Traces	Traces		Traces	
	Oxypeucedanin	55.23 ± 11.68	1.09 ± 0.42	67.48 ± 10.88	1.00 ± 0.43	18.77 ± 6.47	0.25 ± 0.02	13.96 ± 4.72	0.32 ± 0.05
	Oxypeucedanin hydrate	11.69 ± 4.20	1.15 ± 0.45	11.86 ± 3.54	1.08 ± 0.45	3.10 ± 0.37		2.74 ± 0.83	
	Bergamottin	44.27 ± 14.75	19.76 ± 7.58	29.83 ± 21.82	9.75 ± 5.83	Traces	Traces		
	Epoxybergamottin								
	6',7'-dihydroxybergamottin								
Xanthotoxin cluster	Xanthotoxol								
	Xanthotoxin	4.61 ± 1.57		4.07 ± 0.46					
	Imperatorin								
	Heraclenin	5.64 ± 1.21		7.72 ± 0.50		1.77 ± 0.77		1.63 ± 0.73	
	Heraclenol					Traces			
	8-geranyloxypsoralen	21.58 ± 4.21	16.41 ± 7.77	23.97 ± 2.60	8.10 ± 4.02				
Isopimpinellin cluster	Isopimpinellin	87.20 ± 11.92	2.92 ± 1.21	57.16 ± 10.03	2.92 ± 1.35	1.22 ± 0.09	Traces	1.28 ± 0.17	Traces
	Phellopterin	2.83 ± 0.66	Traces	3.28 ± 0.16	1.74 ± 0.97			Traces	
	Byakangelicol	17.25 ± 3.76		13.80 ± 2.56		6.67 ± 1.70		7.26 ± 1.56	
	Byakangelicin								
	Cnidilin	1.91 ± 0.28	0.80 ± 0.22	3.51 ± 0.37	Traces				
	Cnidicin		Traces		Traces				
	TOTAL (mg.kg^{-1})	903.16	44.09	540.87	26.69	58.14	0.25	56.05	0.32

		Alemow	
		Peel	Pulp
	Coumarins		
	Umbelliferone	1.35 ± 0.37	0.51 ± 0.25
	Osthol		
	Aurapten	51.64 ± 28.60	14.47 ± 4.12
	Epoxyaurapten	48.84 ± 11.80	Traces
	Limettin	84.71 ± 25.73	1.94 ± 0.23
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin	Detected	Detected
	Furanocoumarins		
	Psoralen		
Bergapten cluster	Bergaptol		
	Bergapten	10.07 ± 2.43	1.04 ± 0.15
	Isoimperatorin	36.78 ± 6.87	Traces
	Oxypeucedanin	81.44 ± 17.26	
	Oxypeucedanin hydrate	49.72 ± 13.98	0.50 ± 0.02
	Bergamottin	4.73 ± 2.70	Traces
	Epoxybergamottin	10.67 ± 1.52	
	6',7'-dihydroxybergamottin	38.17 ± 6.42	Traces
Xanthotoxin cluster	Xanthotoxol		1.00 ± 0.34
	Xanthotoxin		
	Imperatorin	23.92 ± 6.40	2.49 ± 0.95
	Heraclenin	61.43 ± 8.20	1.02 ± 0.44
	Heraclenol	32.96 ± 5.69	1.73 ± 0.62
	8-geranyloxypsoralen	15.18 ± 6.84	3.18 ± 0.82
Isopimpinellin cluster	Isopimpinellin	4.85 ± 0.45	0.70 ± 0.12
	Phellopterin	40.98 ± 5.30	4.50 ± 1.31
	Byakangelicol	72.00 ± 12.56	1.79 ± 0.72
	Byakangelicin	33.13 ± 8.43	13.46 ± 3.68
	Cnidilin	13.89 ± 1.10	
	Cnidicin	7.14 ± 1.05	Traces
	TOTAL (mg.kg^{-1})	723.60	48.33

Tables J. Concentration (in mg.kg-1 fresh weight ± standard deviation) of the coumarins and the furanocoumarins in the limes peel and pulp extracts. The mention « Traces » is used for compounds that could be detected but not quantitated (3 < S/N < 10) while « Detected » is used when 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin was identified in the samples.!

		Castagnaro bergamot	
		Peel	Pulp
	Coumarins		
	Umbelliferone		
	Osthol	0.39 ± 0.10	0.10 ± 0.02
	Aurapten	0.20 ± 0.09	0.19 ± 0.09
	Epoxyaurapten	10.72 ± 1.61	
	Limettin	25.89 ± 3.66	1.30 ± 0.46
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin	Detected	Detected
	Furanocoumarins		
	Psoralen	0.47 ± 0.13	0.57 ± 0.49
Bergamottin dutier	Bergaptol		8.67 ± 1.02
	Bergapten	388.21 ± 106.06	61.88 ± 43.63
	Isoimperatorin	Traces	0.85 ± 0.17
	Oxypeucedanin	0.80 ± 0.62	0.26 ± 0.01
	Oxypeucedanin hydrate		
	Bergamottin	64.70 ± 38.91	49.67 ± 31.28
	Epoxybergamottin		
	6',7'-dihydroxybergamottin		
Xanthotoxin dutier	Xanthotoxol		
	Xanthotoxin		
	Imperatorin		
	Heraclenin		
	Heraclenol		Traces
	8-geranyloxypsoralen		Traces
Isopimpinellin dutier	Isopimpinellin	2.57 ± 0.27	0.30 ± 0.16
	Phellopterin		
	Byakangelicol		
	Byakangelicin		
	Oxistilin		
	Cnidilcin		
	TOTAL (mg.kg^{-1})	483.76	113.39

Table K. Concentration (in mg.kg-1 fresh weight ± standard deviation) of the coumarins and the furanocoumarins in the bergamot peel and pulp extracts. The mention « Traces » is used for compounds that could be detected but not quantitated (3 < S/N < 10) while « Detected » is used when 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin was identified in the samples.!

		Mountain		Yuzu		Khasi		Nasnaran	
		Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp	Peel	Pulp
	Coumarins								
	Umbelliferone					Traces		1.76 ± 0.40	
	Osthol			1.88 ± 0.44					
	Aurapten	0.36 ± 0.06	0.22 ± 0.05	20.64 ± 11.65	3.60 ± 1.21	0.14 ± 0.03	0.05 ± 0.02	1.39 ± 0.34	0.13 ± 0.04
	Epoxyaurapten			17.54 ± 2.43					
	Limettin	4.17 ± 1.06	0.93 ± 0.37	4.59 ± 1.08		5.04 ± 0.25	0.58 ± 0.10	12.58 ± 3.13	1.30 ± 0.26
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin	Detected		Detected	Detected	Detected	Detected	Detected	Detected
	Furanocoumarins								
	Psoralen								
Bergapten cluster	Bergaptol						Traces	17.66 ± 7.38	6.62 ± 2.07
	Bergapten	3.72 ± 0.95	0.70 ± 0.20	21.91 ± 2.42	Traces	3.53 ± 0.11	0.44 ± 0.06	44.11 ± 10.19	1.56 ± 0.48
	Isoimperatorin	Traces	Traces			Traces		40.54 ± 8.66	2.92 ± 1.01
	Oxypeucedanin	2.37 ± 0.34	0.08 ± 0.01	0.39 ± 0.22	0.30 ± 0.08	1.34 ± 0.20	0.13 ± 0.01	278.71 ± 74.61	6.94 ± 2.40
	Oxypeucedanin hydrate	0.32 ± 0.08	0.20 ± 0.04			Traces		135.44 ± 36.17	14.51 ± 3.34
	Bergamottin	Traces		0.69 ± 0.10	Traces	Traces		55.94 ± 21.99	10.26 ± 3.71
	Epoxybergamottin							61.01 ± 15.30	4.96 ± 1.68
	6',7'-dihydroxybergamottin						Traces	101.36 ± 16.35	12.82 ± 5.90
Xanthotoxin cluster	Xanthotoxol						Traces		
	Xanthotoxin					1.39 ± 0.67	0.21 ± 0.11	Traces	
	Imperatorin								
	Heraclenin					6.13 ± 1.60	Traces		
	Heraclenol					Traces	Traces		
	8-geranyloxypsoralen					15.62 ± 1.75	1.84 ± 0.76		2.26 ± 0.75
Isopimpinellin cluster	Isopimpinellin	2.33 ± 0.39	0.61 ± 0.21	2.61 ± 0.67	0.46 ± 0.19	13.14 ± 3.02	0.39 ± 0.03	6.70 ± 1.28	0.88 ± 0.12
	Phellopterin								
	Byakangelicol					4.05 ± 0.74		Traces	
	Byakangelicin								
	Cnidilin					Traces	Traces		
	Cnidicin								
	TOTAL (mg.kg^{-1})	13.27	2.74	70.25	4.36	50.38	3.64	757.20	65.16

		Mandarin x citron hybrid	
		Peel	Pulp
	Coumarins		
	Umbelliferone		
	Osthol		
	Aurapten	0.80 ± 0.22	0.08 ± 0.02
	Epoxyaurapten		
	Limettin	2.79 ± 0.08	0.48 ± 0.04
	5-geranyloxy-7-methoxycoumarin	Detected	Detected
	Furanocoumarins		
	Psoralen		
Bergapten cluster	Bergaptol		
	Bergapten	2.38 ± 0.26	0.46 ± 0.07
	Isoimperatorin	1.00 ± 0.13	
	Oxypeucedanin	2.14 ± 0.44	0.12 ± 0.01
	Oxypeucedanin hydrate		
	Bergamottin	Traces	
	Epoxybergamottin	Traces	
	6',7'-dihydroxybergamottin		
Xanthotoxin cluster	Xanthotoxol		
	Xanthotoxin		
	Imperatorin		
	Heraclenin		
	Heraclenol	Traces	
	8-geranyloxypsoralen		
Isopimpinellin cluster	Isopimpinellin	1.45 ± 0.20	0.36 ± 0.06
	Phellopterin		
	Byakangelicol	1.00 ± 0.35	
	Byakangelicin	Traces	
	Cnidilin		
	Cnidicin		
	TOTAL (mg.kg^{-1})	11.56	1.50

Tables L. Concentration (in mg.kg-1 fresh weight ± standard deviation) of the coumarins and the furanocoumarins in the unknown origin hybrids peel and pulp extracts. The mention « Traces » is used for compounds that could be detected but not quantitated (3 < S/N < 10) while « Detected » is used when 5-geranyloxy-7-methoxycoumarin was identified in the samples.!

2.3 Étude de dominance de la production de coumarines et furocoumarines chez les espèces secondaires d'agrumes

Les espèces secondaires d'agrumes sont issues de l'hybridation/introgression de deux taxons ancestraux. La capacité de production d'une quantité donnée de coumarines et de furocoumarines chez les hybrides, est déterminée par leurs ascendants. Pour étudier les phénomènes de dominance intervenant lors d'une hybridation, nous avons effectué une série de calculs sur les données quantitatives, obtenues à partir du dosage des coumarines et furocoumarines dans la peau des agrumes. Ce tissu est en effet plus exploitable que la pulpe, que ce soit d'un point de vue qualitatif ou quantitatif. Les calculs consistent d'abord à effectuer la moyenne de chaque composé dosé chez les quatre taxons ancestraux (ex : moyenne des valeurs obtenues pour l'osthol chez les sept pamplemousses étudiés). Nous déterminons ensuite l'intervalle de variation entre deux taxons ancestraux (parents) pour chaque composé et nous ramenons cette valeur à 0 ou 1. Enfin, nous calculons la valeur moyenne obtenue pour chaque composé chez les espèces secondaires dans ce nouveau repère. Les résultats nous permettent de déterminer si l'expression du caractère quantitatif « production de coumarines et furocoumarines » est :

- intermédiaire entre les deux parents (valeur proche de 0,5) : phénomène de codominance ;
- égale à l'un des parents : phénomène de dominance (parent sur-exprimant le composé : valeur proche de 1, parent sous-exprimant le composé : valeur proche de 0) ;
- supérieure aux deux parents : expression transgressive (valeur supérieure à 1).

Les espèces secondaires issues de l'hybridation ou de l'introgression entre mandarinier et pamplemoussier montrent des phénomènes de dominance de l'un ou l'autre des parents (annexes 8-A et 8-B). Pour les hybrides de mandariniers (clémentinier commun, tangor Murcott, Bendiguangju et mandarinier Fortune) et les orangers doux, la production de coumarines et furocoumarines avoisine généralement celle du mandarinier, voire est inférieure (annexe 8-A). Le pamplemoussier est en revanche dominant sur le mandarinier dans le cas de la production de citroptène et d'isopimpinelline chez le clémentinier. Chez l'oranger doux Pineapple, nous avons même une expression transgressive de la production de ces mêmes composés. Chez les orangers amers, le pamplemoussier est dominant sur le mandarinier en ce qui concerne la synthèse d'osthol, d'époxybergamottine et de 6',7'-dihydroxybergamottine (annexe 8-B). Nous avons également une expression transgressive pour le bergaptène. Quant au mandarinier, il est dominant vis-à-vis de la production des autres coumarines et furocoumarines du groupe du bergaptène. Pour les pomelos, nous notons une dominance (voire une expression transgressive) du pamplemoussier pour la production d'auraptène, d'époxyauraptène, de bergaptol (uniquement pour le pomelo Duncan), de bergamottine, d'époxybergamottine et de 6',7'-dihydroxybergamottine (annexe 8-B). Pour les autres composés dosés, c'est généralement le mandarinier qui domine sur le pamplemoussier.

Pour les espèces secondaires issues de l'hybridation d'un cédratier avec un mandarinier (citronnier Rough, limettier Rangpur, limettier Rangpur jaune et citronnier Volkamer), c'est généralement le mandarinier (faible producteur) qui est dominant sur le cédratier (annexe 8-C). Seule le limettier Rangpur jaune montre une dominance du cédratier

sur le mandarinier, voire une expression transgressive de la production de furocoumarines du groupe du bergaptène en particulier.

Les espèces secondaires issues du croisement entre un papeda et un cédratier présentent des comportements relativement différents quant à la production de coumarines et furocoumarines (annexe 8-D). Le limettier Coppenrhad montre globalement une dominance du taxon ancestral à plus faibles teneurs en composés (généralement le cédratier, sauf dans le cas du citroptène, de l'impératorine, de l'héraclénine, de l'héraclénol, de la byakangélicine et de la cnidicine) (annexe 8-D). Les limettiers Mexicain et Alemow montrent une expression transgressive de trois furocoumarines du groupe de la xanthotoxine spécifiques des cédratiers : l'impératorine, l'héraclénine et l'héraclénol (annexe 8-D). Mises à part l'isoimpératorine et la bergamottine, les teneurs en composés du groupe du bergaptène avoisinent celles des cédratiers. De même, les quantités de furocoumarines du groupe de l'isopimpinelline sont généralement proches des cédratiers, sauf pour le byakangélicol où l'on a une expression transgressive chez les limettiers Mexicain et Alemow (annexe 8-D).

Le mandarinier Nasnaran est issu de l'hybridation d'un papeda et d'un mandarinier. Nous observons une codominance (voire une expression transgressive) du papeda pour la production de coumarines et de la plupart des furocoumarines du groupe du bergaptène (annexe 8-E). En revanche, le mandarinier est dominant dans le cas des furocoumarines du groupe de la xanthotoxine et de l'isopimpinelline.

Chez les orangers doux, les hybrides de mandariniers et les limettiers et citronniers de type *C. medica* × *C. reticulata* (sauf le limettier Rangpur), nous observons une dominance totale du mandarinier sur le pamplemoussier dans la composition en coumarines et furocoumarines. Les pomelos et l'oranger amer Granito montrent une dominance du pamplemoussier sur le mandarinier. Les autres orangers amers présentent une dominance partielle du mandarinier sur le pamplemoussier, mais les teneurs en coumarines et furocoumarines chez ces espèces les classent tout de même dans les producteurs intermédiaires à forts. Chez les limettiers de type *C. micrantha* × *C. medica*, nous observons une dominance partielle voire totale du cédratier sur le papeda. Le mandarinier Nasnaran montre une dominance partielle du cédratier, mais sa composition en coumarines et furocoumarines le classe tout de même avec les forts producteurs.

2.4 Chémotypage du tangelo Minneola (*Citrus paradisi* × *Citrus reticulata*)

Dans l'article présenté précédemment, nous avons fait l'hypothèse que les schémas de sélection variétale visant à diminuer les taux de coumarines et furocoumarines dans les agrumes, devaient préférentiellement faire intervenir des mandarines (cf. publication n°2, « Breeding programs for selection against coumarins and furanocoumarins in *Citrus*: Global and targeted approaches »). En effet, il s'agit du taxon ancestral produisant le moins de coumarines et furocoumarines et pouvant transmettre ce caractère à certains hybrides après plusieurs générations (ex : oranges douces ou hybrides de mandarines). Pour asseoir un peu plus cette hypothèse, j'ai décidé de réaliser le chémotypage d'une soixante-deuxième variété d'agrume : le tangelo Minneola, qui est plus connu et consommé aux États-Unis. Cette espèce

est issue de l'hybridation du pomelo Duncan et du mandarinier doux Dancy. J'ai pu récolter trois fruits à maturité au jardin botanique de Villers-Lès-Nancy. J'ai ensuite fait les prélèvements de peau et de pulpe tel que je l'ai décrit dans la section « Matériel et méthodes ».

Tout comme la mandarine Dancy, le tangelo Minneola contient de très faibles quantités de coumarines et de furocoumarines dans la peau et dans la pulpe (figure 34). Seul l'auraptène a pu être quantifié dans ces deux tissus, mais il n'est présent qu'en très faible concentration (< 1 mg/kg de poids frais, annexe 9). Le pomelo Duncan en revanche contient de grandes quantités de coumarines, mais surtout de furocoumarines du groupe du bergaptène. Notons tout de même que le tangelo n'a pas été récolté au même endroit ni au même moment que la mandarine Dancy et le pomelo Duncan. Or les concentrations en coumarines et furocoumarines dépendent en partie des conditions environnementales.

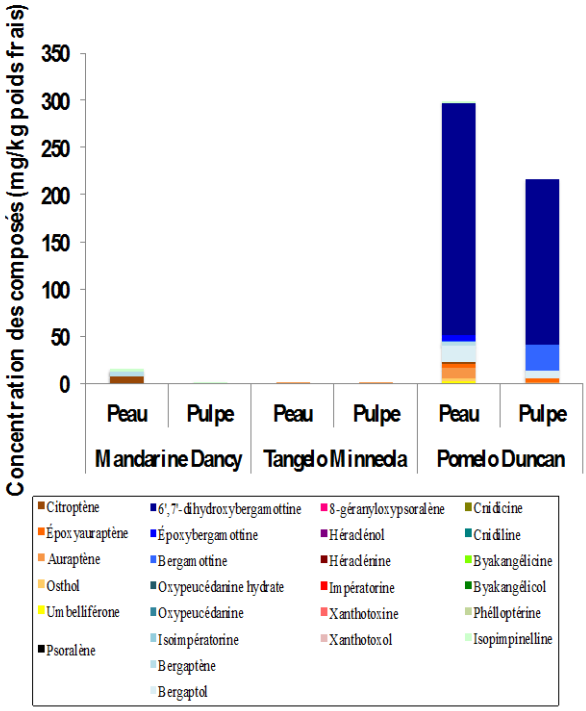


Figure 34. Concentration moyenne (mg/kg poids frais) des coumarines et furocoumarines dans les extraits de peau et de pulpe du tangelo Minneola et de ses deux ascendants, la mandarine Dancy et le pomelo Duncan.

Le tangelo Minneola est issu du rétrocroisement d'un pomelo avec un mandarinier. Il ne produit qu'une très faible quantité d'auraptène et ne produit pas de furocoumarines. Son chémotype se rapproche donc plus du mandarinier que du pomelo.

2.5 Discussion

2.5.1 Répartition des coumarines et furocoumarines dans les tissus du fruit

Les résultats de quantification des coumarines et furocoumarines dans la peau et la pulpe des variétés d'agrumes montrent que la peau contient généralement de plus fortes concentrations mais aussi une plus grande diversité de ces composés (figures 30 et 31 et tableaux S3 de la publication n°2). Il est aujourd'hui connu que la peau des agrumes contient plus de furocoumarines que la pulpe (Ishihara *et al.*, 2011) et il a été montré que celles provoquant l'effet pomelo (ex : époxybergamottine) étaient présentes en plus fortes quantités dans les jus commerciaux pressés entièrement avec la peau que dans les jus pressés à la main ne contenant donc pas de peau (Wangensteen *et al.*, 2003). En outre, une étude a identifié les cellules épithéliales bordant les cavités schizolysigènes du flavédo de pomelo, comme étant spécialisées dans la synthèse de métabolites tels que les coumarines et furocoumarines (Voo *et al.*, 2012). Leur présence dans les glandes sécrétrices permet la protection du fruit lors d'attaques par des pathogènes, sans quoi le développement des graines assurant la reproduction de la plante pourrait être compromis (Ben-Yehoshua *et al.*, 2008). Il en va de même pour d'autres molécules que les coumarines et furocoumarines, telles que les flavones polyméthoxylées qui assurent également la protection du fruit contre les attaques de champignons par exemple (Del Rio *et al.*, 1998).

2.5.2 Contre-sélection des coumarines et furocoumarines chez les agrumes

Le génome des orangers doux présente une contribution de 60 % de mandarinier et de 40 % de pamplemoussier (Curk, 2014). Chez les hybrides de mandarinier, la contribution de ce taxon ancestral est encore plus élevée (70 % à 85 %) (Curk, 2014). Or la composition en coumarines et furocoumarines des orangers doux et des hybrides de mandarinier montre une dominance totale du mandarinier sur le pamplemoussier (annexe 8-A). Les faibles teneurs en coumarines et furocoumarines chez ces espèces secondaires sont donc liées à une plus forte contribution du mandarinier dans leur génotype. Les rétrocroisements d'espèces d'agrumes avec des mandariniers pourraient donc contribuer à l'obtention de variétés produisant peu de coumarines et furocoumarines.

Les résultats que nous avons obtenus lors du chémotypage du tangelo Minneola sont en accord avec cette hypothèse. Cet agrume est issu du croisement d'un pomelo avec un mandarinier doux. Son génotype montre une plus forte contribution de la part du mandarinier (70 %) en comparaison avec le pamplemousse (30 %) (Curk, 2014). Or nous n'avons pu quantifier qu'une seule coumarine (en faible quantité) dans la peau et la pulpe de cet agrume, l'auraptène (annexe 9). Le rétrocroisement d'un pomelo (lui-même issu de l'hybridation d'un oranger doux et d'un pamplemoussier) avec un mandarinier permet donc de diminuer les taux

de coumarines et furocoumarines chez l'hybride obtenu. Par ailleurs, une précédente étude a montré que les variétés de tangelos commercialisées en Floride ne contiennent aucune furocoumarine susceptible d'engendrer l'effet pomelo (Widmer, 2005). La lutte engagée contre ce phénomène pourrait donc passer par la création de variétés d'agrumes produisant peu de coumarines et furocoumarines, en rétrocroisant des producteurs intermédiaires ou faibles avec des mandariniers.

2.6 Conclusion

L'utilisation de notre méthode d'UPLC-MS pour l'analyse de coumarines et furocoumarines dans la peau et la pulpe de variétés d'agrumes, nous a été fortement utile pour mieux comprendre l'organisation de la synthèse de ces composés dans ces fruits. Tout d'abord, nous avons pu mettre en évidence une production différentielle des coumarines et furocoumarines entre les tissus du fruit, mais aussi entre les variétés d'agrumes. La peau des agrumes qui présente des poches schizolysigènes contient de plus fortes quantités de composés, assurant ainsi en partie la protection des graines utiles à la reproduction de la plante. Les coumarines et furocoumarines dosées dans la pulpe peuvent être jusqu'à 300 fois moins concentrées que dans la peau. Par ailleurs, il existe de grandes disparités quant aux concentrations des composés d'une variété à l'autre. Les papedas sont les plus gros producteurs de coumarines et furocoumarines. Ils sont suivis par les pamplemoussiers, les orangers amers, les pomelos, le bergamotier et les cédratiers qui produisent également de grandes quantités de composés. Les citronniers sont des producteurs intermédiaires de coumarines et furocoumarines. Enfin, les variétés les moins productrices sont les mandariniers et certains de leurs descendants : les orangers doux, les hybrides de mandariniers et le tangelo. Les limettiers sont un peu plus hétérogènes, car en fonction de leur origine, ils peuvent produire de plus ou moins grandes quantités de composés. L'identification de variétés d'agrumes plus ou moins productrices de coumarines et furocoumarines était utile dans la suite de mon travail, qui consistait à identifier des gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes. En effet, nous pensions pouvoir diminuer la liste des gènes candidats à tester, en réalisant une analyse différentielle de leur niveau d'expression, dans des fruits fortement et faiblement producteurs de coumarines et furocoumarines.

Par ailleurs, grâce à la richesse des données obtenues, nous sommes allés plus loin dans la compréhension de la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes. En particulier, les profils métaboliques des variétés nous ont permis de retrouver une structuration de leur diversité génétique, en accord avec les données de constitution phylogénétique des agrumes (cf. publication n°2, « Coumarin and furanocoumarin chemical diversity in relation to the recent advances in *Citrus* phylogeny »). En effet, en fonction de l'identification des coumarines et furocoumarines dans la peau des fruits, nous avons mis en évidence quatre groupes de variétés, correspondant aux quatre taxons ancestraux et à leurs hybrides les plus proches. Ces quatre groupes se distinguent par la présence de coumarines et furocoumarines présentant différents motifs : hydroxylation, méthylation, prénylation, époxydation ou hydratation. Ces groupements sont ajoutés par des enzymes en différentes

positions des structures de base. La présence ou l'absence d'un composé dans un groupe de variétés, suggère également la présence ou l'absence de l'enzyme permettant sa formation. Ces résultats sont donc également très intéressants pour nous, dans le cadre de l'élucidation de la voie de biosynthèse des furocoumarines chez les agrumes.

Enfin, nous avons identifié les mandariniers et leurs hybrides présentant un génotype avec une plus forte contribution de mandarinier, comme étant les variétés de notre étude produisant le moins de coumarines et furocoumarines. Leurs teneurs chez ces hybrides montrent également une dominance du mandarinier sur le pamplemoussier. Nous avons donc émis l'hypothèse que les rétrocroisements de variétés d'agrumes avec des mandariniers permettraient l'obtention de variétés d'agrumes produisant peu de coumarines et furocoumarines. Le tangelo Minneola (*C. paradisi* × *C. reticulata*) en est un bon exemple, car il ne produit qu'une faible quantité d'auraptène et il a été montré qu'il n'intervient pas dans l'effet pomelo.

Partie III :

Identification et caractérisation fonctionnelle de cytochromes P450 potentiellement impliqués dans la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes

3. Partie III : Identification et caractérisation fonctionnelle de cytochromes P450 potentiellement impliqués dans la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes

La détermination des variétés d'agrumes faiblement et fortement productrices de coumarines et furocoumarines, est essentielle pour l'identification de gènes impliqués dans leur voie de biosynthèse. Les agrumes du genre *Citrus* étant étroitement liés d'un point de vue génétique, nous avons émis l'hypothèse qu'ils étaient tous pourvus des gènes impliqués dans la synthèse des coumarines et furocoumarines. Pour expliquer le niveau de production de ces composés, nous avons également fait l'hypothèse que ces gènes étaient exprimés de façon différentielle chez ces variétés de *Citrus*, impliquant ainsi potentiellement des facteurs de transcription différents.

Afin d'explorer ces hypothèses, Victoire Coqueret a réalisé dans le cadre de son stage de Master, un travail préliminaire visant à pointer quelques gènes candidats. Les travaux qu'elle a réalisés ont consisté à effectuer la quantification de l'expression de certains gènes, chez deux variétés d'agrumes produisant de grandes quantités de coumarines et furocoumarines (pomelo et bergamote) et une variété d'agrume en produisant peu (orange douce). Le choix des gènes a été basé sur des données bibliographiques et donc sur des gènes dont la fonction avait déjà été identifiée par le passé. En utilisant les séquences de différents *CYP71AJ* (Larbat *et al.*, 2007 ; Larbat *et al.*, 2009) et de *CYP82C* d'*A. thaliana* (Kruse *et al.*, 2008), Victoire Coqueret a réalisé une recherche de séquences homologues au sein de banques d'ADNg d'orange douce (*C. sinensis*) et de clémentine (*C. clementina*) rendues publiques sur le site Web Phytozome. Elle a ainsi pu identifier sept gènes codant pour des cytochromes P450 et présentant des homologies de séquences significatives avec les enzymes recherchées. Une analyse par PCR (suivie d'un séquençage), a permis de mettre en évidence que ces sept gènes étaient bien présents dans les trois variétés de plantes choisies. La quantification de l'expression de ces sept gènes, en utilisant une approche de qPCR, a mis en évidence une expression plus forte de quatre d'entre eux chez le pomelo et la bergamote par rapport à l'orange douce, renforçant ainsi notre hypothèse de travail. Parmi ces quatre gènes, trois proviennent de la banque d'ADNg de clémentine (*Ciclev10018132*, *Ciclev10025349*, *Ciclev10028201*) et un provient de la banque d'ADNg d'orange douce (*orange1.1g048790*) (Coqueret, 2013).

J'ai poursuivi ce travail préliminaire en clonant et en réalisant la caractérisation fonctionnelle des enzymes codées par ces quatre gènes. Les principaux résultats obtenus sont décrits dans cette troisième partie.

3.1 Identification et caractérisation fonctionnelle de cytochromes P450 de la sous-famille CYP82D chez les *Citrus*

3.1.1 Clonage de séquences codantes et expression hétérologue dans la levure

3.1.1.1 Clonage de 2 séquences d'ADNc d'intérêt

L'un des gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de coumarines et furocoumarines sur lesquels j'ai travaillé est le gène de clémentine *Ciclev10025349*. Il s'agit d'un gène homologue aux *CYP82C* d'*A. thaliana* (51,5 % d'identité protéique avec CYP82C2 et 52,8 % avec CYP82C4) codant pour des enzymes impliquées dans l'hydroxylation de la xanthotoxine en position 5 (Kruse *et al.*, 2008) et celle de l'indole-3-carbonyle nitrile pour donner le 4-hydroxyindole-3-carbonyle nitrile (Rajniak *et al.*, 2015). Il faut toutefois noter que l'hydroxylation de la xanthotoxine par CYP82C est due à une promiscuité de substrat, dans la mesure ou la xanthotoxine est absente chez *A. thaliana*.

Afin de cloner la séquence codante de *Ciclev10025349*, il était nécessaire de passer par une extraction d'ARN totaux. Or l'extraction d'ARN d'agrume n'est pas toujours facile pour différentes raisons telles que la présence de molécules inhibitrices ou le faible rendement des extractions. J'ai donc travaillé sur différents tissus et organes de ces plantes (ex : feuilles, fruits). Par ailleurs, ne pouvant pas exclure une variabilité allélique de ce gène liée aux variétés, j'ai également choisi de réaliser ces extractions sur différents types d'agrumes. J'ai ainsi extrait les ARN totaux de feuilles de lime Gallet (*C. aurantifolia*), de peau de bigarade (*C. aurantium*), de Combava (*C. hystrix*) et de pomelo Ruby (*C. paradisi*) en utilisant le mini kit RNeasy® pour plantes de Qiagen. Les agrumes provenaient du jardin botanique du Montet à Villers-Lès-Nancy. Après avoir vérifié l'intégrité des ARN extraits par analyse sur un gel d'agarose et après avoir déterminé leurs concentrations, j'ai réalisé une transcription inverse en utilisant des amorces aléatoires. J'ai ensuite effectué l'amplification de *Ciclev10025349* en utilisant le kit PrimeSTAR® Max et les amorces créées et testées par Victoire Coqueret (tableau 20). L'amorce antisens a été modifiée par l'ajout d'une séquence codant pour une queue poly histidines artificielle, permettant par la suite la détection de la protéine correspondante par Western Blot (cf. section « Matériel et méthodes »).

Amorces	Séquences
Ciclev10025349 dir	5' ATGGAGTTCCTATTCACAGCTGTAATAATCACTGCCC 3'
Ciclev10025349 rev	5' TCAATGATGATGATGATGATGAAAGCCATAGGGGTTGGCA 3'

Tableau 20. Amorces utilisées pour l'amplification de séquences codantes d'agrumes correspondant au *Ciclev10025349* de clémentine.

Le codon initiateur est indiqué en bleu et le codon stop en rouge. La séquence correspondant à la queue poly histidines composée de 6 histidines est indiquée en vert. Pour information, l'hybridation des amorces est réalisée à 50 °C lors des 5 premiers cycles et 57 °C lors des 30 cycles suivants.

Les PCR réalisées sur les ADNc provenant de pomelo Ruby et de Combava m'ont permis d'amplifier des fragments d'ADN d'environ 1500 pb, ce qui correspond à une taille

cohérente pour des séquences codant pour des cytochromes P450. J'ai ensuite purifié ces fragments et je les ai cloné dans le vecteur pCR®8/GW, comme cela a été décrit dans la section « Matériel et méthodes ».

Les résultats du séquençage ont confirmé le clonage de deux séquences d'ADNc de pomelo Ruby et de Combava (annexe 10) présentant de fortes homologies avec la séquence *Ciclev10025349* de clémentine. Les séquences protéiques obtenues chez le pomelo Ruby et le Combava présentent 96,4 % d'identité avec celle de clémentine et plus de 97 % d'homologie (tableau 21). Les différences sont encore moins marquées entre les séquences protéiques de pomelo Ruby et de Combava avec 97,6 % d'identité et 98,5 % de similarité (tableau 21). L'alignement des trois séquences protéiques montre qu'il y existe très peu de différences entre Ciclev10025349 de clémentine et les protéines homologues chez le pomelo Ruby et chez le Combava (figure 35). Cette analyse *in silico* indique donc que les séquences codantes clonées chez ces deux plantes sont des variants alléliques. Ces gènes ont été soumis au comité international de nomenclature des cytochromes P450 (D. Nelson) et ont été nommés *CYP82D64* v1 et v2.

	Clémentine	Pomelo R.	Combava
Clémentine	ID	96,4 %	96,4 %
Pomelo R.	97,2 %	ID	97,6 %
Combava	97,9 %	98,5 %	ID

Tableau 21. Pourcentages d'identité et de similarité entre les séquences protéiques des CYP82D64 de *Citrus*.

Les pourcentages d'identité (en rose) et de similarité (en bleu) ont été déterminés en utilisant le logiciel BioEdit (matrice de similarité BLOSUM62).

Afin d'exprimer les protéines correspondantes dans un système levure, j'ai transféré par LR-recombinaison les deux séquences codantes dans le vecteur navette pYeDP60_GW®, comme je l'ai décrit dans la section « Matériel et méthodes ». Les séquences codantes insérées dans ce plasmide ont de nouveau été vérifiées par séquençage avant d'être utilisées dans des expérimentations ultérieures.

```
                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                     5         15         25         35         45         55
Clémentine      MEFLFTAVII TALLVFASRN LVKKAGNKKR GAPEAGGGWP VIGHLHLLGG PEPLHKVLGK
Pomelo R.       .......... ......V... .......... .......... .......... ..........
Combava         .......... ......V... M......... .......... .......... ..........

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                     65         75         85         95        105        115
Clémentine      IADKYGPILT IKIGVRRTLV VSNWEIAKEC LTTSDKVFAT RPKTVAGHIL CYDSSLLGFV
Pomelo R.       .......... ..M....... .......... .......... .......D.. ..........
Combava         .......... ..V....... .......... .......... .......D.. ..........

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    125        135        145        155        165        175
Clémentine      PYGHYWRQIR KIATLELLSS YRLESLKYVR ESEVRTCLKE LYNLWDAGLD KAPVLVDMKK
Pomelo R.       .......... .......... .......... .......... .....G.... ..........
Combava         .......... .......... .......... .......... .......... ..........

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    185        195        205        215        225        235
Clémentine      WCEYVTLNVI LRMVVGKRCN ISISQKGTSS DQGWKDELSR FFEFMGKLVV SDALPFLRWL
Pomelo R.       .......... .......... .......... .......... .......... ..........
Combava         .......... .......... .........N .......... .......... ..........

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    245        255        265        275        285        295
Clémentine      DIGGDERLMK KTARELDLIM QRWLDEHRRK GDSGDYQIKG REENFMGAML SILDDIGAQE
Pomelo R.       .......... .......... .......... ......L... ..D....... ..........
Combava         ...R..M... .......... .......... .......... ..D....... ..........

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    305        315        325        335        345        355
Clémentine      FPGRDADTIN KATCLALILG GSDTTSGTLT WAISLLLNNR HALKKAQEEL DQQVGKERAV
Pomelo R.       .......... .......T.. .......... .......... .......... ..........
Combava         .......... .......... .......... .......... .......... ..........

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    365        375        385        395        405        415
Clémentine      DESDTENLVY LQAIIKETLR LYPAGPLLAP REAMEDCTVS GYHVPAGTRL MINAWKIQRD
Pomelo R.       .....Q.... .......... .......... .......... .......... ..........
Combava         .....Q.... .......... .......... .......... .......... ..........

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                    425        435        445        455        465        475
Clémentine      PSVWENPSAF QPERFLPGHG AHADVDVRGQ QFELIPFGSG RRSCPGASSA LQVLHLTLAR
Pomelo R.       .R...T.... .......... .......... .......... ....X..... ..........
Combava         .R........ ........Y. .......... .......... .......... ..........

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ...
                    485        495        505        515        525
Clémentine      LLHSFELATP LDQPVDMSES PGLTIPKATP LKVLLSPRLL PANPYGF--- ---
Pomelo R.       ...A...... .......... .......... .......... A......HHH HHH
Combava         ...A...... .......... ....V..... .......... .......HHH HHH
```

Figure 35. Alignement des séquences protéiques déduites des séquences nucléotidiques des *CYP82D64* de clémentine (*Ciclev10025349*), de pomelo Ruby et de Combava.

L'alignement a été réalisé en utilisant le logiciel BioEdit (alignement ClustalW). Les séquences protéiques des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava présentent bien la queue poly histidines artificielle ajoutée au niveau de l'extrémité C-terminale.

3.1.1.2 Expression hétérologue des *CYP82D64* dans la levure

Les plasmides recombinants ont été introduits dans des levures *S. cerevisiæ* WAT11 compétentes. Les protéines recombinantes ont ensuite été produites dans les conditions de cultures décrites dans la section « Matériel et méthodes ». Pour réaliser des tests enzymatiques, il est nécessaire de réaliser une purification partielle des enzymes produites. Les cytochromes P450 étant des enzymes membranaires, j'ai préparé des fractions microsomales à partir des levures transformées et mises en culture.

La caractérisation fonctionnelle d'une enzyme est une démarche complexe car elle nécessite de réaliser un criblage métabolique très large. L'observation de la métabolisation d'un composé permet de savoir si celui-ci est un substrat de l'enzyme ou non. À l'inverse, l'absence de métabolisation n'est pas forcément une preuve que le composé n'est pas un substrat de l'enzyme testée. En effet, cette absence de métabolisation peut également être liée à l'absence d'enzymes fonctionnelles. Avant d'initier un criblage approfondi de composés, il est donc nécessaire de vérifier que la protéine d'intérêt est réellement produite dans les levures. Pour cela, j'ai choisi de mettre en évidence les protéines en utilisant une approche par immunodétection. J'ai donc effectué un SDS-PAGE permettant la séparation des protéines présentes dans les microsomes, suivi par un Western-Blot (figure 36). Ce dernier permet la révélation de la protéine d'intérêt grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques à la queue poly histidines artificielle ajoutée et couplés à des phosphatases alcalines incubées en présence de NBT/BCIP. Lors de ces expérimentations, j'ai également transformé des levures avec le vecteur pYeDP60_GW® vide et préparé des microsomes à partir de ces levures, afin d'avoir un contrôle négatif.

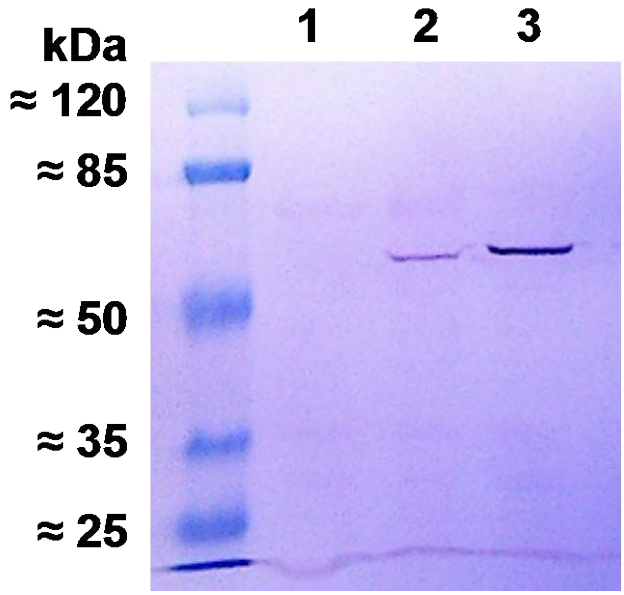


Figure 36. Mise en évidence de la production des CYP82D64 chez la levure par Western-Blot.

(1) Contrôle négatif (vecteur pYeDP60_GW® vide) ; (2) CYP82D64 de pomelo Ruby ; (3) CYP82D64 de Combava. Le marqueur de poids moléculaire à gauche permet d'estimer la taille des protéines recombinantes produites.

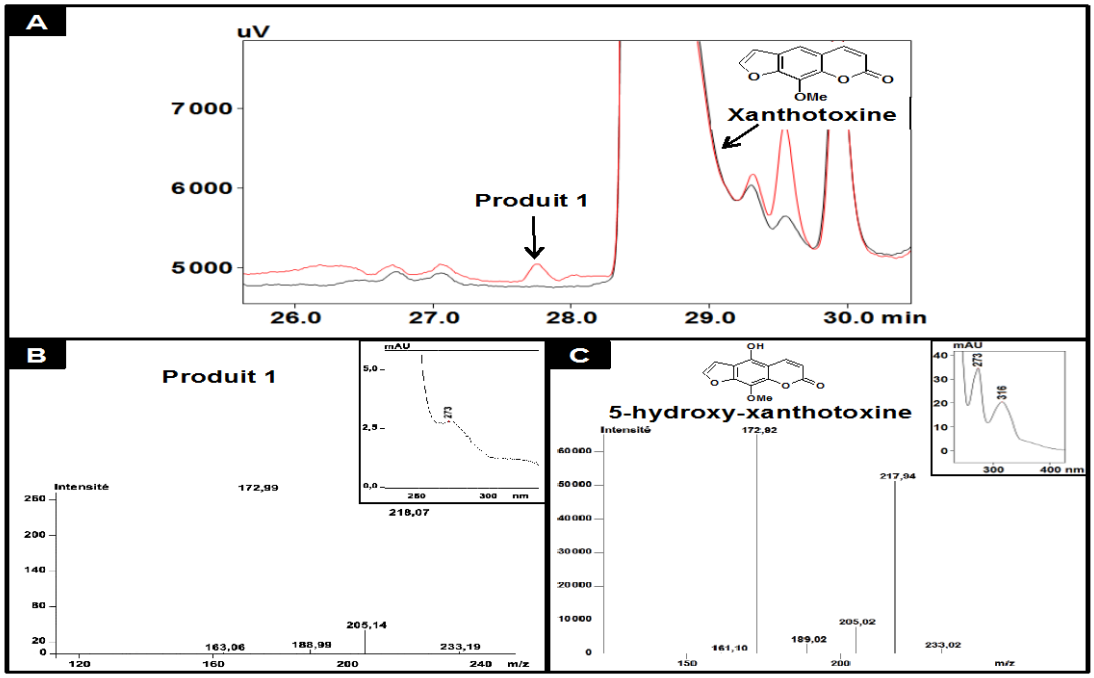
Les microsomes préparés à partir de levures transformées par les *CYP82D64* de pomelo Ruby et de Combava contiennent bien la protéine d'intérêt (figure 36, puits 2 et 3 respectivement). La bande correspondant à CYP82D64 de pomelo Ruby (figure 36, puits 2) est moins intense que celle correspondant à CYP82D64 de Combava (figure 36, puits 3), indiquant une plus faible concentration de la première enzyme. Par ailleurs, aucune bande n'est visible pour les protéines contenues dans les microsomes de levures transformées par le vecteur vide (figure 36, puits 1). Les poids théoriques attendus des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava sont de 59,5 kDa et 59,7 kDa respectivement (en comptant la queue poly histidines). Les distances de migration des protéines lors du SDS-PAGE sont cohérentes avec ces données (figure 36, puits 2 et 3).

3.1.2 Caractérisation fonctionnelle des CYP82D64 *in vitro*

3.1.2.1 Criblage métabolique

Pour déterminer la fonction des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava, j'ai effectué des tests de métabolisation avec un large panel de coumarines (annexe 3) et de furocoumarines (annexe 4). Les incubations ont été réalisées en présence ou en absence de cofacteur NADPH et avec des microsomes préparés à partir de levures transformées avec les gènes d'intérêt ou avec le vecteur pYeDP60_GW® vide (contrôle négatif). Cette dernière modalité permet de vérifier qu'une éventuelle métabolisation n'est pas due à des protéines endogènes des levures. Les incubations ont été réalisées pendant 30 min. J'ai ensuite extrait les produits de réaction à l'acétate d'éthyle avant de les analyser par chromatographie liquide.

Le criblage réalisé avec 12 coumarines et 22 furocoumarines, a permis de mettre en évidence une métabolisation pour un petit nombre de composés. Ainsi, pour les incubations de CYP82D64 de pomelo Ruby en présence de xanthotoxine et de cofacteur NADPH, les analyses HPLC correspondantes m'ont permis de mettre en évidence la formation d'un produit, qui n'apparaît pas en absence de cofacteur NADPH (figure 37-A). Ce composé n'apparaît pas non plus lors des incubations de microsomes de levures transformées par le vecteur vide, que ce soit en présence ou en absence de cofacteur NADPH. Ce produit possède le même temps de rétention (27,7 min) et le même spectre d'absorbance (avec une intensité du signal maximale à 273 nm) que le standard commercial de la 5-hydroxy-xanthotoxine (figure 37-B et C). Une analyse plus fine par LC-MS/MS a permis de confirmer l'identité du produit qui possède le même temps de rétention (23,6 min) et le même spectre de fragmentation (avec des intensités maximales de fragmentations pour des m/z de 172, 217 et 205, pour un m/z total de 233) que le standard commercial de la 5-hydroxy-xanthotoxine (figure 37-B et C).

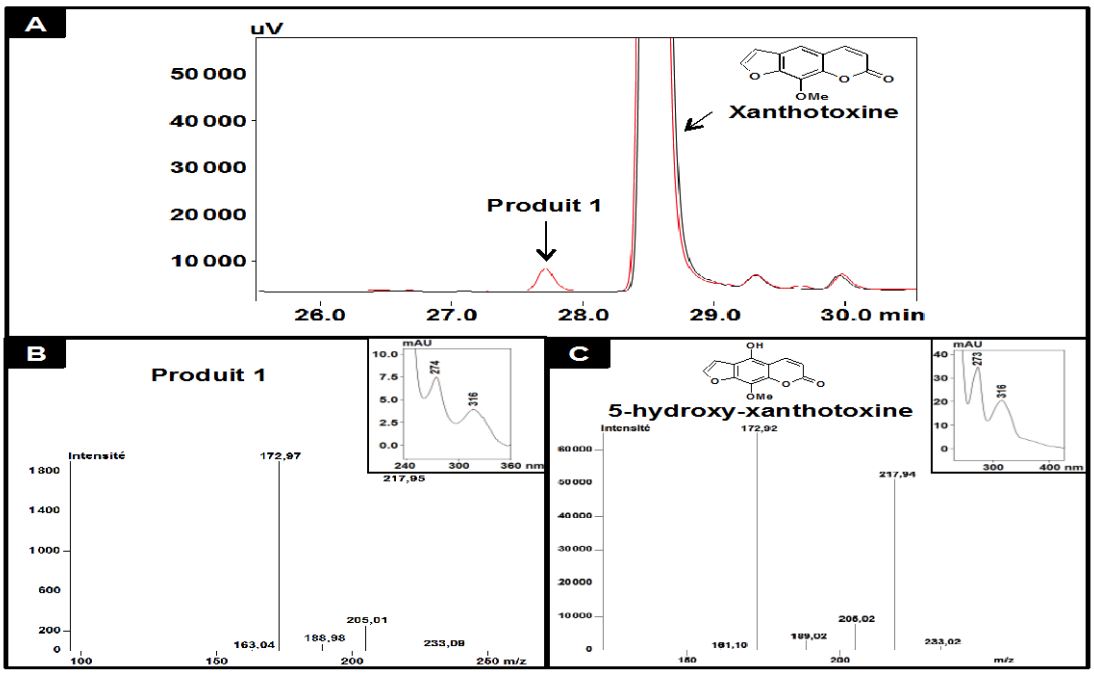


Figure':'CYP82D64'Pomelo'+'Xanthotoxine'

Figure 37. Produit de métabolisation de la xanthotoxine par CYP82D64 de pomelo Ruby.

(A) Analyse HPLC permettant la détection d'un produit de métabolisation de la xanthotoxine en présence de cofacteur NADPH (en rouge) et son absence lorsqu'il n'y a pas de cofacteur NADPH (en noir) ; (B) Spectre d'absorbance UV et spectre de masse en mode ionisation positive [M + H^+] du produit de métabolisation de la xanthotoxine ; (C) Spectre d'absorbance UV et spectre de masse en mode ionisation positive [M + H^+] du standard commercial de la 5-hydroxy-xanthotoxine.

Dans le cas de CYP82D64 de Combava, les incubations effectuées ont permis de mettre en évidence la métabolisation de deux composés. Comme pour CYP82D64 de pomelo Ruby, la xanthotoxine est métabolisée en 5-hydroxy-xanthotoxine par CYP82D64 de Combava (figure 38). Le produit formé possède en effet le même temps de rétention, le même spectre d'absorbance et le même spectre de fragmentation que ceux du standard commercial de la 5-hydroxy-xanthotoxine (figure 38-B et C).

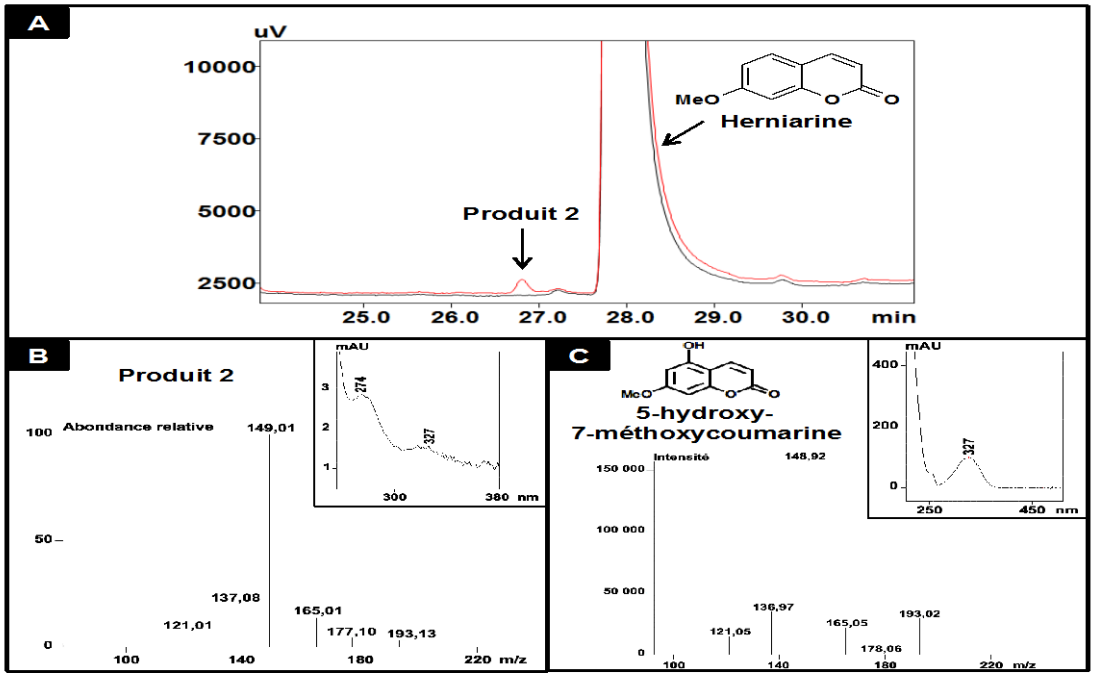


Figure':'CYP82D64'Combava'+'Xanthotoxine'

Figure 38. Produit de métabolisation de la xanthotoxine par CYP82D64 de Combava.

(A) Analyse HPLC permettant la détection d'un produit de métabolisation de la xanthotoxine en présence de cofacteur NADPH (en rouge) et son absence lorsqu'il n'y a pas de cofacteur NADPH (en noir) ; (B) Spectre d'absorbance UV et spectre de masse en mode ionisation positive [M + H^+] du produit de métabolisation de la xanthotoxine ; (C) Spectre d'absorbance UV et spectre de masse en mode ionisation positive [M + H^+] du standard commercial de la 5-hydroxy-xanthotoxine.

En plus de la 5-hydroxy-xanthotoxine, j'ai également mis en évidence que les microsomes préparés à partir de levures transformées par pYeDP60_GW® -CYP82D64 de Combava pouvaient métaboliser une coumarine. Il s'agit de l'herniarine (ou 7-méthoxycoumarine), qui n'est métabolisée qu'en présence de cofacteur NADPH (figure 39-A). Des analyses HPLC-DAD et LC-MS/MS m'ont permis d'identifier le produit formé qui possède les mêmes caractéristiques que la 5-hydroxy-7-méthoxycoumarine (temps de rétention en HPLC : 26,7 min ; absorbance maximale à 274 et 327 nm ; temps de rétention en LC-MS/MS : 22,2 min ; intensités maximales de fragmentations pour des m/z de 149, 137 et 165, pour un m/z total de 192,9 ; figure 39-B et C).



Figure':'CYP82D64'Combava'+'Herniarine'

Figure 39. Produit de métabolisation de l'herniarine par CYP82D64 de Combava.

(A) Analyse HPLC permettant la détection d'un produit de métabolisation de l'herniarine en présence de cofacteur NADPH (en rouge) et son absence lorsqu'il n'y a pas de cofacteur NADPH (en noir) ; (B) Spectre d'absorbance UV et spectre de masse en mode ionisation positive [M + H^+] du produit de métabolisation de l'herniarine ; (C) Spectre d'absorbance UV et spectre de masse en mode ionisation positive [M + H^+] du standard commercial de la 5-hydroxy-7-méthoxycoumarine.

En résumé, CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava métabolisent la xanthotoxine en 5-hydroxy-xanthotoxine *in vitro*. CYP82D64 de Combava peut également métaboliser l'herniarine pour former de la 5-hydroxy-7-méthoxycoumarine *in vitro*.

3.1.2.2 Caractéristiques enzymatiques

Suite au criblage métabolique ayant permis de déterminer la fonction des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava *in vitro*, j'ai entrepris la caractérisation enzymatique de ces

deux protéines. Pour cela, j'ai déterminé les conditions de pH et de température optimales d'activité pour chacun de leurs substrats et j'ai mesuré leurs constantes cinétiques.

3.1.2.2.1 pH optimal d'activité

J'ai déterminé le pH optimal d'activité des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava avec leurs substrats respectifs en réalisant des incubations dans du tampon NaPi à une concentration de 0,1 M, à un pH allant de 6,0 à 8,0 et à une température de 28 °C. L'activité d'hydroxylation de la xanthotoxine en position 5 est effective sur toute la gamme de pH testée pour les deux cytochromes P450. Le pH optimal d'activité est de 7,3 pour CYP82D64 de pomelo et d'environ 7,4 pour CYP82D64 de Combava (figures 40 et 41 respectivement).

J'ai également établi que CYP82D64 ne métabolise l'herniarine qu'à partir d'un pH de 6,4 et l'activité optimale est obtenue pour un pH de 7,2 (figure 42). Les quantités de 5-hydroxy-7-méthoxycoumarine formées étant trop faibles, je n'ai pas pu les quantifier dans les échantillons. Les graphiques obtenus sont donc exprimés en aires de pics, soit en unité arbitraire (UA).

Par ailleurs, les écarts-types parfois importants observés (figures 40 à 42) peuvent s'expliquer par le fait que les solutions de microsomes ne sont pas aussi homogènes que des solutions de protéines solubles. Les quantités protéiques peuvent donc varier d'une incubation à l'autre. Par ailleurs, l'accessibilité d'un substrat à l'enzyme et à son site actif est également plus difficile dans les échantillons de microsomes qu'en solution.

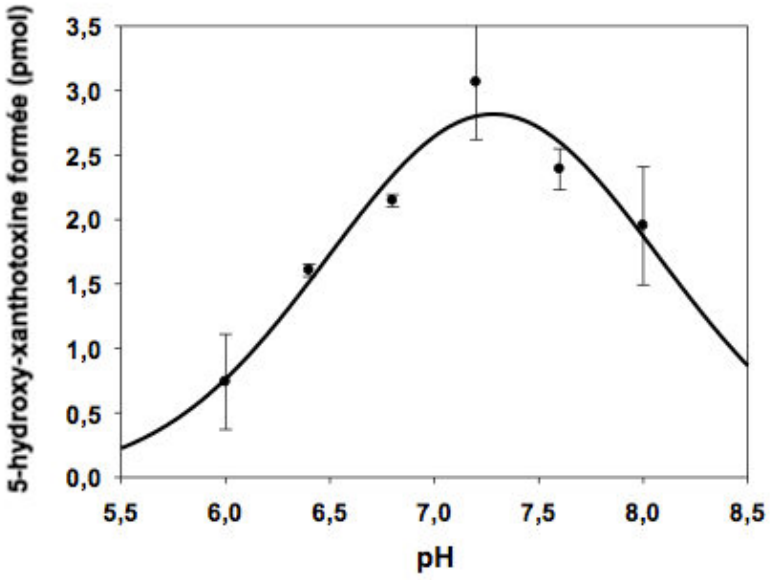


Figure 40. Détermination du pH optimal d'activité de CYP82D64 de pomelo Ruby en présence de xanthotoxine.

Les incubations ont été faites en triplicats. Les quantités de 5-hydroxy-xanthotoxine formées ont été calculées grâce à une gamme étalon allant de 0,5 à 25 pmol (annexe 5). Les aires ont été mesurées à la longueur d'onde correspondant à une intensité maximale du signal, soit 273 nm.

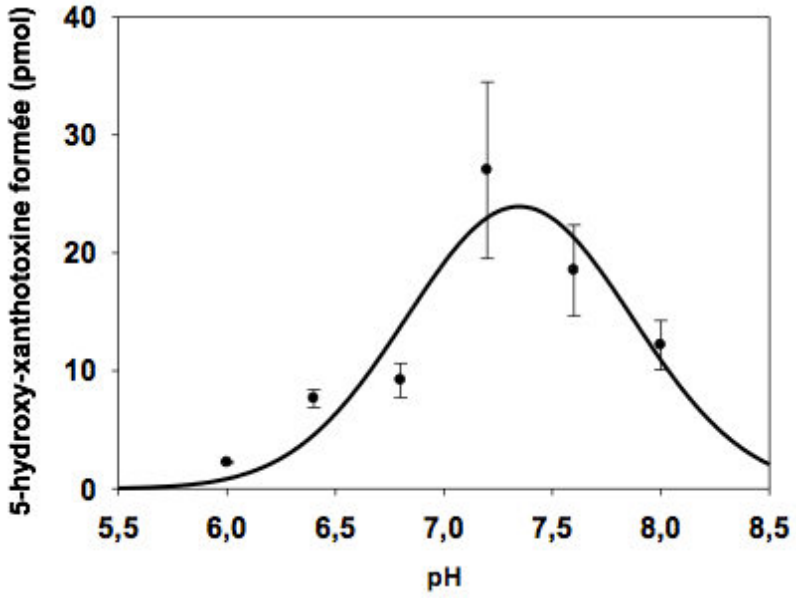


Figure 41. Détermination du pH optimal d'activité de CYP82D64 de Combava en présence de xanthotoxine.

Les incubations ont été faites en triplicats. Les quantités de 5-hydroxy-xanthotoxine formées ont été calculées grâce à une gamme étalon allant de 0,5 à 25 pmol (annexe 5). Les aires ont été mesurées à la longueur d'onde correspondant à une intensité maximale du signal, soit 273 nm.

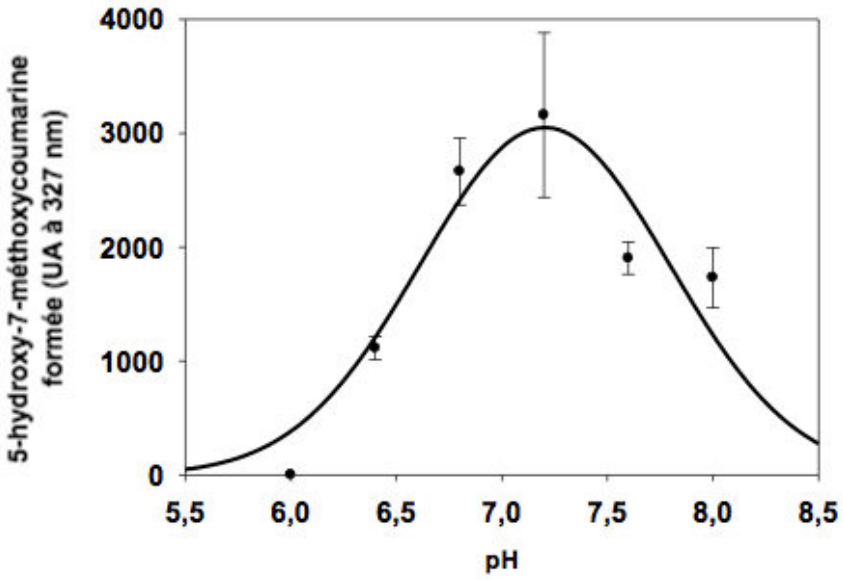


Figure 42. Détermination du pH optimal d'activité de CYP82D64 de Combava en présence d'herniarine.

Les incubations ont été faites en triplicats. Les aires des pics correspondant à la 5-hydroxy-7-méthoxycoumarine ont été mesurées à la longueur d'onde correspondant à une intensité maximale du signal, soit 327 nm.

3.1.2.2.2 Température optimale d'activité

Pour déterminer la température optimale d'activité de chaque enzyme avec son/ses substrat(s), j'ai réalisé des incubations dans du tampon NaPi à une concentration de 0,1 M à pH 7,5 et à des températures allant de 15 °C à 40 °C. Pour chacun des substrats identifiés, les enzymes sont actives sur toute la gamme de températures testées. La température d'activité optimale de CYP82D64 de pomelo Ruby pour l'hydroxylation de la xanthotoxine en position 5 est de 29 °C (figure 43). Pour CYP82D64 de Combava, les hydroxylations de la xanthotoxine et de l'herniarine sont catalysées de façon optimale à une température de 28 °C (figures 44 et 45). De même que pour les tests de pH, les quantités de 5-hydroxy-7-méthoxycoumarine formées n'étaient pas assez élevées pour pouvoir les quantifier. Les graphiques obtenus sont donc à nouveau exprimés en aires de pics (UA).

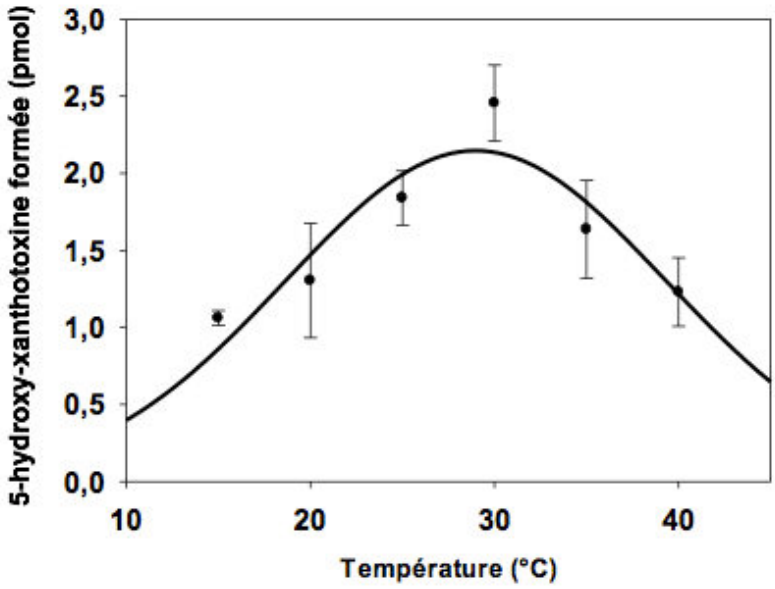


Figure 43. Détermination de la température optimale d'activité de CYP82D64 de pomelo Ruby en présence de xanthotoxine.

Les incubations ont été faites en triplicats. Les quantités de 5-hydroxy-xanthotoxine formées ont été calculées grâce à une gamme étalon allant de 0,5 à 25 pmol (annexe 5). Les aires ont été mesurées à la longueur d'onde correspondant à une intensité maximale du signal, soit 273 nm.

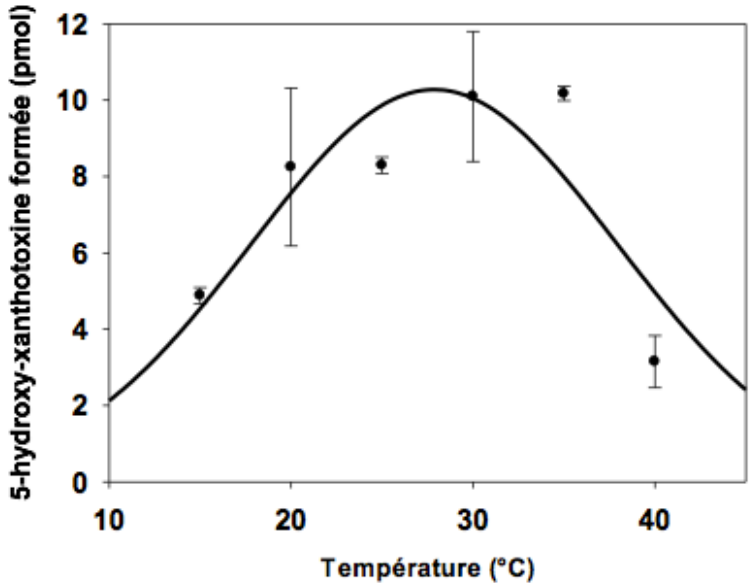


Figure 44. Détermination de la température optimale d'activité de CYP82D64 de Combava en présence de xanthotoxine.

Les incubations ont été faites en triplicats. Les quantités de 5-hydroxy-xanthotoxine formées ont été calculées grâce à une gamme étalon allant de 0,5 à 25 pmol (annexe 5). Les aires ont été mesurées à la longueur d'onde correspondant à une intensité maximale du signal, soit 273 nm.

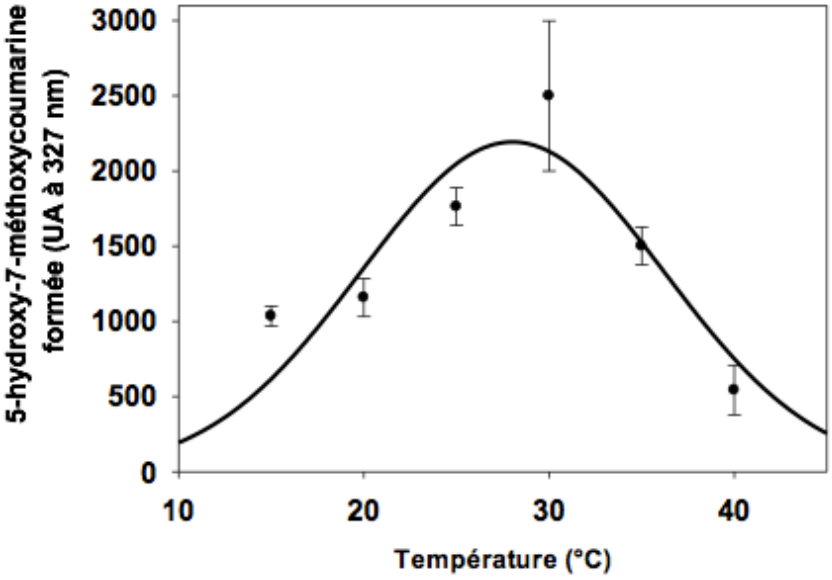


Figure 45. Détermination de la température optimale d'activité de CYP82D64 de Combava en présence d'herniarine.

Les incubations ont été faites en triplicats. Les aires des pics correspondant à la 5-hydroxy-7-méthoxycoumarine ont été mesurées à la longueur d'onde correspondant à une intensité maximale du signal, soit 327 nm.

3.1.2.2.3 Linéarité des réactions

Les quantités de 5-hydroxy-7-méthoxycoumarine formées lors des incubations de CYP82D64 avec l'herniarine étant trop faibles, je n'ai pas pu déterminer la linéarité de cette réaction et donc les constantes cinétiques de l'enzyme envers ce substrat. En revanche, j'ai pu déterminer la linéarité des réactions d'hydroxylation de la xanthotoxine par CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava, en effectuant des incubations sur une période d'une heure (cf. Matériel et méthodes). La formation de 5-hydroxy-xanthotoxine par CYP82D64 de pomelo Ruby est linéaire pendant environ 5 minutes et atteint un plateau après 20 minutes (figure 46). Pour CYP82D64 de Combava, elle est linéaire pendant près de 20 minutes et semble atteindre un plateau au bout d'une heure (figure 47). Pour déterminer les constantes cinétiques des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava, nous avons choisi un temps d'incubation pour lequel la production de 5-hydroxy-xanthotoxine est linéaire, soit 5 minutes et 15 minutes respectivement (figures 46 et 47).

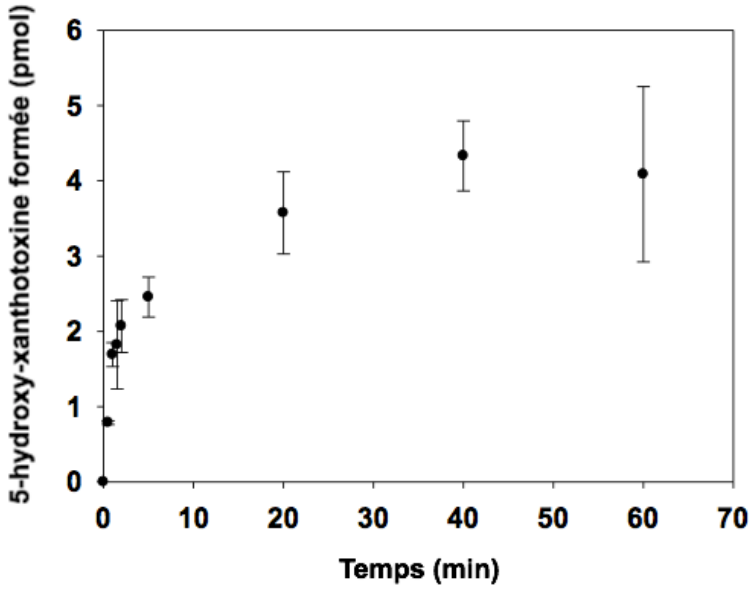


Figure 46. Accumulation de 5-hydroxy-xanthotoxine par CYP82D64 de pomelo Ruby en fonction du temps.

Les incubations ont été faites en triplicats. Les quantités de 5-hydroxy-xanthotoxine formées ont été calculées grâce à une gamme étalon allant de 0,5 à 25 pmol (annexe 5). Les aires ont été mesurées à la longueur d'onde correspondant à une intensité maximale du signal, soit 273 nm.

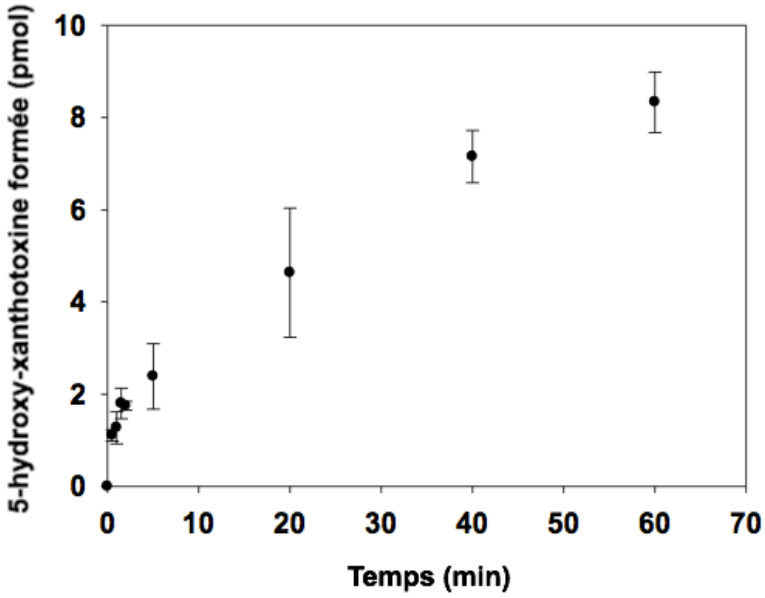


Figure 47. Accumulation de 5-hydroxy-xanthotoxine par CYP82D64 de Combava en fonction du temps.

Les incubations ont été faites en triplicats. Les quantités de 5-hydroxy-xanthotoxine formées ont été calculées grâce à une gamme étalon allant de 0,5 à 25 pmol (annexe 5). Les aires ont été mesurées à la longueur d'onde correspondant à une intensité maximale du signal, soit 273 nm.

3.1.2.2.4 Constantes cinétiques

J'ai déterminé les constantes cinétiques des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava en effectuant des incubations de 5 minutes et 15 minutes respectivement, avec des concentrations en xanthotoxine allant de 0,5 à 300 µM. Pour le reste, les conditions expérimentales restent inchangées et sont décrites dans la section « Matériel et méthodes ». Pour chaque enzyme, les quantités de 5-hydroxy-xantotoxine formées dépendent des quantités de xanthotoxine fournies et sont reliées par une courbe hyperbolique typique des enzymes Michaeliennes (figures 48 et 49). Comme je l'ai expliqué précédemment, les écarts-types parfois importants que l'on peut observer sont dus à la nature même des solutions de fractions microsomales, qui ne sont pas très homogènes et où les substrats accèdent plus difficilement aux enzymes.

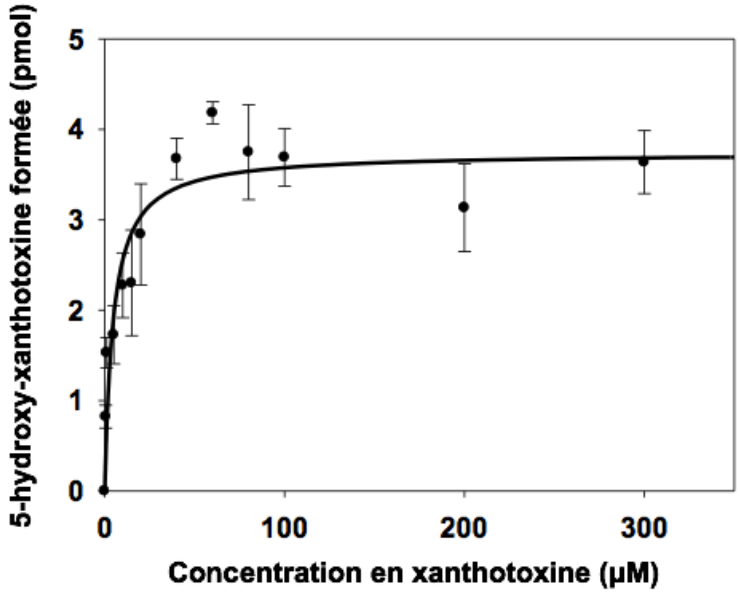


Figure 48. Quantité de 5-hydroxy-xanthotoxine formée par CYP82D64 de pomelo Ruby en fonction de la concentration en xanthotoxine.

Les incubations ont été faites en triplicats. Les quantités de 5-hydroxy-xanthotoxine formées ont été calculées grâce à une gamme étalon allant de 0,5 à 25 pmol (annexe 5). Les aires ont été mesurées à la longueur d'onde correspondant à une intensité maximale du signal, soit 273 nm.

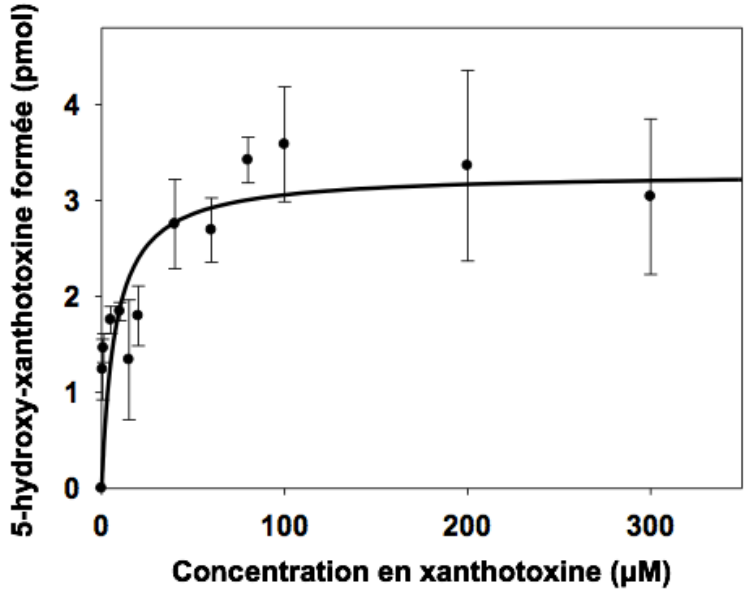


Figure 49. Quantité de 5-hydroxy-xanthotoxine formée par CYP82D64 de Combava en fonction de la concentration en xanthotoxine.

Les incubations ont été faites en triplicats. Les quantités de 5-hydroxy-xanthotoxine formées ont été calculées grâce à une gamme étalon allant de 0,5 à 25 pmol (annexe 5). Les aires ont été mesurées à la longueur d'onde correspondant à une intensité maximale du signal, soit 273 nm.

Les résultats obtenus ont été analysés avec le logiciel Sigmaplot afin d'obtenir les constantes d'affinité K_m de chaque enzyme pour son substrat (tableau 22). Les valeurs des K_m

des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava pour la xanthotoxine sont du même ordre de grandeur avec 4,6 et 7,4 µM respectivement, montrant tout de même une meilleure affinité de la xanthotoxine pour CYP82D64 de pomelo Ruby (tableau 22). Les K_m obtenus étant relativement bas (inférieurs à 10 µM), la xanthotoxine est possiblement un substrat naturel des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava.

Enzyme	Substrat(s)	Produit(s)	K_m (µM)
CYP82D64 de pomelo Ruby	Xanthotoxine	5-hydroxy-xanthotoxine	4,6 ± 1,7
CYP82D64 de Combava	Xanthotoxine	5-hydroxy-xanthotoxine	7,4 ± 4,0
	Herniarine	5-hydroxy-7-méthoxycoumarine	ND

Tableau 22. Constantes cinétiques des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava obtenues avec le logiciel Sigmaplot.

ND : Non Déterminée ; les constantes cinétiques de CYP82D64 de Combava avec l'herniarine n'ont pas pu être calculées du fait des trop faibles quantités de 5-hydroxy-7-méthoxycoumarine obtenues lors des différentes incubations.

3.1.3 Étude *in silico* des CYP82D64

Dans le cadre de mon travail, j'ai mis en évidence une fonction différente entre les *CYP82D64* de pomelo Ruby et de Combava. La comparaison des séquences nucléotidiques de ces deux gènes indique un certain nombre de différences qui sont avérées. En effet, j'ai amplifié les mêmes gènes à partir de différents ARN extraits de pomelo Ruby et de Combava de manière indépendante. Ces différences sont à l'origine de la modification de certains acides aminés dans les séquences protéiques des enzymes codées par ces deux gènes (figure 35). Afin d'avoir une idée de l'impact de ces modifications, nous avons établi une collaboration avec les docteurs Dave Ritchie et Bernard Maigret du LORIA de Vandœuvre-Lès-Nancy. Nous avons ainsi pu obtenir les structures tridimensionnelles des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava avec leur hème et leurs ligants, ainsi que les résultats de docking des différents substrats dans le site actif de ces deux enzymes.

Les structures 3D de CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava ont été modélisées grâce à leur homologie avec un cytochrome P450 humain dont la structure 3D était déjà connue. Il s'agit de CYP17A1 (code PDB : 3SWZ), dont la séquence protéique présente 45,0 % d'identité avec celle de CYP82D64 de pomelo Ruby et 43,6 % d'identité avec celle de CYP82D64 de Combava. Les séquences protéiques des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava sont très proches, comme nous avons pu le voir précédemment (tableau 21 et figure 35). Cependant, l'alignement des structures primaires basé sur l'alignement des structures 3D de ces enzymes met en évidence une région de boucle différente entre les deux protéines (figure 50). En particulier, CYP82D64 présente une lysine en position 512 (512K) qui s'étend loin dans le site catalytique de l'enzyme (figures 50 et 51-A). Cette lysine est absente chez CYP82D64 de Combava (figure 50). En revanche, CYP82D64 de Combava possède une

arginine en position 518 (518R) qui remplit un espace de la poche catalytique qui est vide chez CYP82D64 de pomelo Ruby (figure 50).

```
CYP82D64 Pomelo :  SESPGLTIPK-A-TPLKV-LL--SPRLLAANPYGFHHHH
CYP82D64 Combava : SESPGLTVPKATPLKV-LLSPRLLPA----NPYGFHHHH
                   @@@@@@@*@@ * *** * **  *@*    @@@@@@@@@@
                                      !(Pomelo 512K)
                                           !(Combava 518R)
```

Figure 50. Alignement des structures primaires de CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava basé sur l'alignement de leurs structures 3D.

Alignement réalisé à l'aide du logiciel KPAX (version 4.0). Symboles : @ = acide aminé identique ; * = acide aminé différent ; ! = acide aminé à l'origine d'une différence dans la structure tridimensionnelle de la protéine.

Ces deux observations suggèrent que les ligands ne se positionnent pas de la même manière dans le site actif. C'est effectivement le cas, tel que le montre les modélisations des structures tridimensionnelles des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava avec leurs ligands (figure 51). La xanthotoxine et l'herniarine se positionnent à chaque fois de façon parallèle à l'hème dans le site actif des CYP82D64, mais elles ne sont pas orientées de la même façon (figure 51).

Les résultats de docking permettent de mieux appréhender les interactions entre le ligand et l'enzyme au niveau de la poche catalytique. Dans le cas de CYP82D64 de pomelo Ruby, nous observons de fortes interactions entre la xanthotoxine et l'enzyme au niveau du site actif, en particulier avec la lysine en position 512 (figure 52-A). Cette interaction n'est pas présente entre la xanthotoxine et CYP82D64 de Combava au niveau du site actif. En revanche, de nombreuses autres interactions sont présentes et l'arginine en position 518 remplit un espace de la poche catalytique (figure 52-C).

Pour l'herniarine, on recense très peu d'interactions avec les acides aminés présents dans le site actif de CYP82D64 de Combava (figure 52-D) et ces interactions ne sont qu'hydrophobes au niveau de la poche catalytique de CYP82D64 de pomelo Ruby qui ne métabolise pas l'herniarine (figure 52-B).

Les structures 3D de CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava présentent des différences au niveau d'une région de boucle interagissant avec le site actif. Il en résulte des différences d'interaction avec les ligands, qui ne se positionnent pas de la même façon dans la poche catalytique.

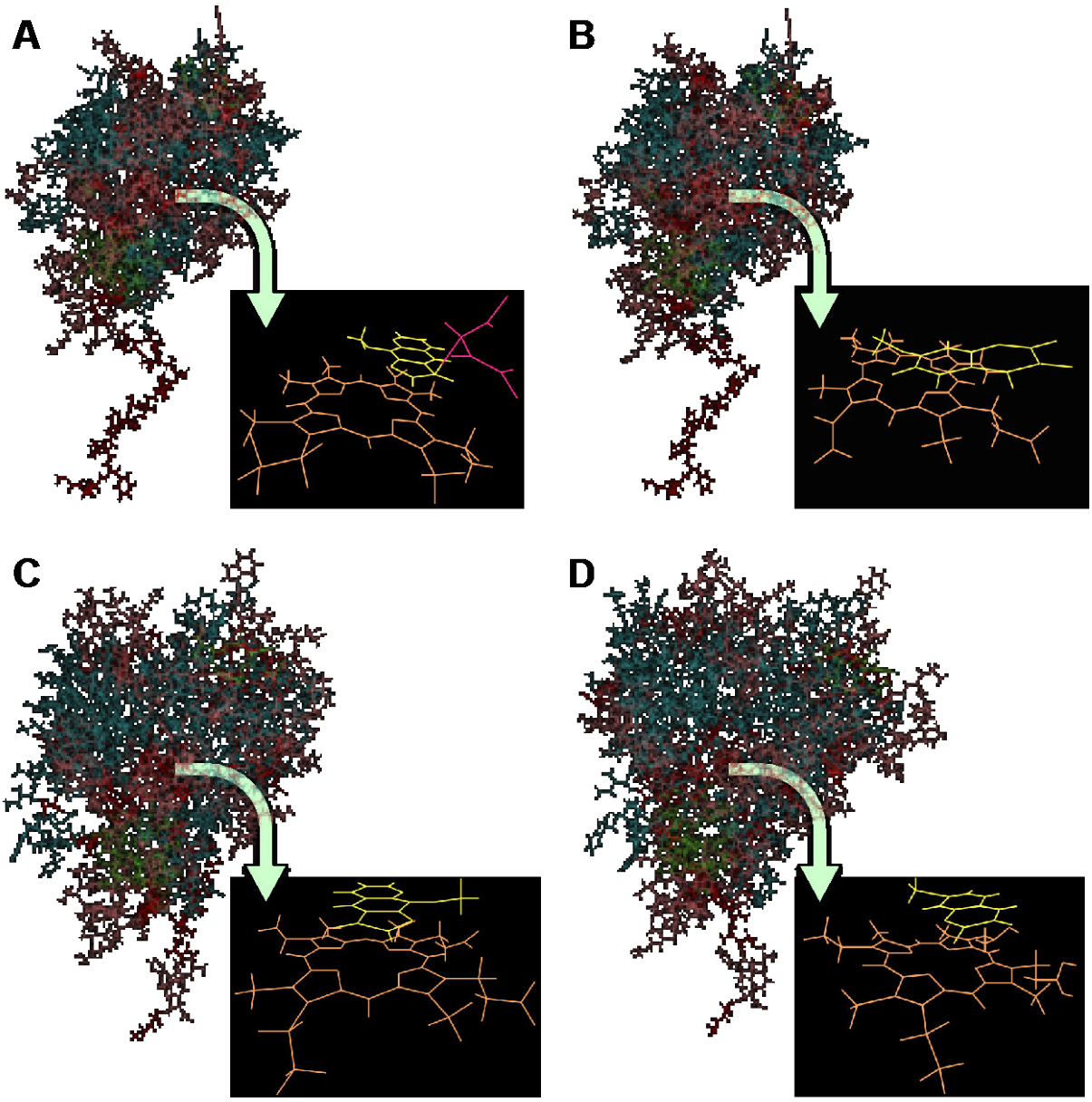


Figure 51. Modélisation des structures tridimensionnelles des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava avec leurs ligands.

Pour les structures tridimensionnelles des cytochromes P450 : bleu = hélices, vert = feuillets, rose = coudes, rouge = boucles. Pour les zoom sur le site actif : jaune = ligand, orange = hème. (A) Conformation tridimensionnelle de CYP82D64 de pomelo Ruby lié à la xanthotoxine et zoom sur le site actif (en rose : partie de la lysine en position 512 liée à la xanthotoxine) ; (B) Conformation tridimensionnelle de CYP82D64 de pomelo Ruby avec l'herniarine (qui n'est pas son substrat) et zoom sur le site actif ; (C) Conformation tridimensionnelle de CYP82D64 de Combava avec la xanthotoxine et zoom sur le site actif ; (D) Conformation tridimensionnelle de CYP82D64 de Combava avec l'herniarine et zoom sur le site actif.

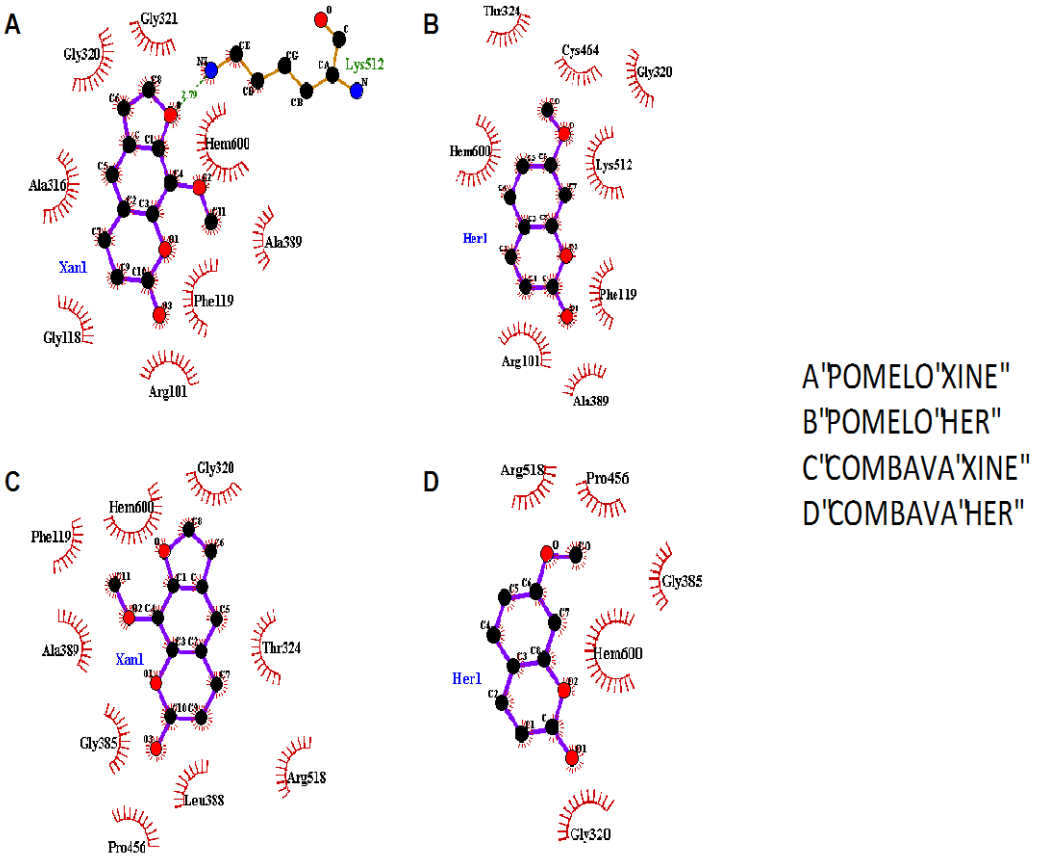


Figure 52. Visualisation des interactions entre les CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava et leurs substrats au niveau du site actif des enzymes.

(A) Site actif de CYP82D64 de pomelo Ruby et interactions avec la xanthotoxine ; (B) Site actif de CYP82D64 de pomelo Ruby et interactions avec l'herniarine (NB : l'herniarine n'est pas un substrat de CYP82D64 de pomelo Ruby) ; (C) Site actif de CYP82D64 de Combava et interactions avec la xanthotoxine ; (D) Site actif de CYP82D64 de Combava et interactions avec l'herniarine.

3.1.3 Suivi de l'expression de *CYP82D64* de pomelo Ruby et de la production de coumarines et furocoumarines au cours de la maturation des fruits

Suite à mes travaux de caractérisation fonctionnelle *in vitro* des *CYP82D64*, j'ai voulu vérifier s'il existait un lien entre les niveaux d'expression de ces gènes dans différents tissus d'agrumes à différents stades de maturité et les quantités de coumarines et furocoumarines produites. Je n'ai pas pu obtenir assez de fruits pour effectuer cette étude chez le Combava. En revanche, j'ai pu obtenir trois fruits de pomelo Ruby à trois stades de maturité différents : jeune, intermédiaire et mûr, au jardin botanique du Montet à Villers-Lès-Nancy (figure 53).

Pour chaque fruit, j'ai ainsi préparé des échantillons de flavédo, d'albédo et de pulpe pour l'analyse des niveaux d'expression de *CYP82D64* et pour l'analyse phytochimique des coumarines et furocoumarines produites.

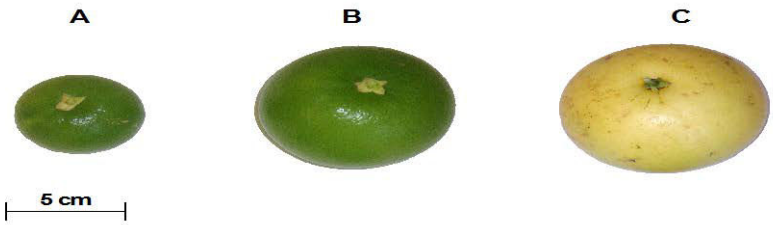


Figure 53. Fruits de pomelo Ruby à différents stades de maturité.

(A) Jeune fruit : à ce stade, le fruit est de petite taille (5,6 cm de diamètre en moyenne), le flavédo est encore vert et la pulpe n'est composée que de poils à jus vides. (B) Fruit à un stade intermédiaire : le fruit a presque atteint sa taille à maturité (7,7 cm de diamètre en moyenne) mais le flavédo est encore vert. Les poils à jus commencent à se remplir de jus acide. (C) Fruit mûr : à ce stade, le fruit ne grossit pas d'avantage (8,4 cm de diamètre en moyenne). Le flavédo a viré dans les tons jaunes suite à l'alternance de journées chaudes et de nuits froides. La pulpe est composée de poils à jus remplis de jus acidulé et sucré.

3.1.3.1 Niveau d'expression de *CYP82D64* de pomelo Ruby

Pour réaliser la quantification relative de l'expression de *CYP82D64* de pomelo Ruby, j'ai utilisé le gène *EF1α* comme gène de référence (cf. section « Matériel et méthodes »). J'ai ainsi effectué les qPCR sur ces deux gènes cibles en utilisant les amorces que nous avions créées (tableau 23).

Amorces	Séquences
EF1α dir	5' TGGTGATGCTGGGTTTGTTA 3'
EF1α rev	5' CACGCTCTTGATGACTCCAA 3'
CYP82D64 dir (1)	5' GGCGCCATGCTTTCCA 3'
CYP82D64 rev (1)	5' ACGACCGGGAAATTCTTGTG 3'
CYP82D64 dir (2)	5' CACCACGTGAAGCAATGGAA 3'
CYP82D64 rev (2)	5' TGCCAGCCGGGACATG 3'

Tableau 23. Amorces utilisées pour la quantification relative de l'expression de *CYP82D64* de pomelo Ruby.

Le gène *EF1α* correspond au contrôle endogène. Deux couples d'amorces ont été utilisés pour l'amplification de *CYP82D64* : (1) et (2).

J'ai vérifié l'efficacité des amorces pour l'amplification des gènes *EF1α* et *CYP82D64* en suivant la méthode décrite dans la section « Matériel et méthodes ». Pour chaque type de tissu (flavédo, albédo, pulpe) et chaque stade de maturité de fruit (jeune, intermédiaire, mûr) testés, j'ai obtenu des droites standard reliant les C_T aux quantités d'ADNc ciblé dans une gamme de cinq dilutions. Les équations de ces droites pour le gène *EF1α* dans les différents tissus et à différents stades de maturité du pomelo Ruby sont très proches, confirmant ainsi la stabilité de l'expression de ce gène (tableau 24). L'efficacité des amorces n'a pas pu être déterminée pour les échantillons d'albédo de pomelos mûrs du fait d'un niveau d'expression trop faible de *CYP82D64* dans ce tissu à ce stade de maturité. En revanche, pour les autres tissus et/ou autres stades de maturité, nous avons obtenu des valeurs généralement comprises entre 95 % et 105 %, ce qui indique des PCR efficaces (tableau 24). Seule la pulpe présente de moins bonnes efficacités pour l'amplification de *CYP82D64* de pomelo Ruby aux différents stades de maturité étudiés (tableau 24).

Gène	Tissu	Stade de maturité du fruit	Efficacité des amorces (%)	Équation de droite (y = ax + b) et coefficient de corrélation			Couple d'amorces	Concentration des amorces (µM)
				a	b	r^2		
EF1	Flavédo	Jeune	100,940	-3,300	22,666	0,998	*EF1α*	0,2
		Intermédiaire	98,911	-3,348	22,671	0,997	*EF1α*	0,2
		Mûr	98,468	-3,359	22,662	0,999	*EF1α*	0,2
	Albédo	Jeune	99,153	-3,342	23,535	0,998	*EF1α*	0,2
		Intermédiaire	101,832	-3,279	23,225	0,996	*EF1α*	0,2
		Mûr	101,789	-3,280	22,607	0,996	*EF1α*	0,2
	Pulpe	Jeune	98,927	-3,348	22,393	0,998	*EF1α*	0,2
		Intermédiaire	101,017	-3,298	22,175	0,995	*EF1α*	0,2
		Mûr	101,556	-3,285	23,809	0,995	*EF1α*	0,2
CYP82D64	Flavédo	Jeune	103,452	-3,242	22,506	0,998	*CYP82D64* (1)	0,2
		Intermédiaire	97,453	-3,384	22,562	0,998	*CYP82D64* (1)	0,2
		Mûr	104,391	-3,221	28,449	0,998	*CYP82D64* (1)	0,2
	Albédo	Jeune	104,161	-3,226	29,871	0,994	*CYP82D64* (2)	0,2
		Intermédiaire	107,313	-3,158	30,282	0,980	*CYP82D64* (2)	0,2
		Mûr	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Pulpe	Jeune	97,980	-3,371	22,899	0,999	*CYP82D64* (2)	0,2
		Intermédiaire	94,350	-3,465	23,662	0,998	*CYP82D64* (2)	0,2
		Mûr	116,298	-2,985	30,928	0,985	*CYP82D64* (2)	0,2

Tableau 24. Vérification de l'efficacité des amorces pour l'amplification des gènes *EF1* et *CYP82D64* de pomelo Ruby.

L'efficacité des amorces a été testée pour chaque tissu et chaque stade de maturité. Elle est indiquée en pourcentage et est suivie par l'équation et le coefficient de corrélation obtenus pour chaque échantillon. Les couples d'amorces correspondants sont indiqués, ainsi que la concentration utilisée. Pour l'albédo des fruits mûrs, l'efficacité des amorces reste non déterminée (ND).

Une fois l'efficacité des amorces vérifiées, j'ai effectué les qPCR visant à quantifier de façon relative *CYP82D64* dans le flavédo, l'albédo et la pulpe de pomelo Ruby à trois stades de maturité différents. Le niveau d'expression relatif de *CYP82D64* diminue de façon significative dans le flavédo, l'albédo et la pulpe du pomelo Ruby au cours du développement du fruit (figure 54). Dans le flavédo, l'expression de *CYP82D64* est divisée par environ 1,3 entre le stade « jeune fruit » et le stade intermédiaire et par plus de 25 entre le stade intermédiaire et le fruit mûr (figure 54). Au niveau de l'albédo, les quantités relatives de *CYP82D64* sont divisées par environ 2,8 entre le jeune fruit et le fruit à un stade intermédiaire

(figure 54). Dans le fruit mûr, le niveau d'expression de *CYP82D64* dans l'albédo est en dessous des limites de détection et n'a donc pas pu être quantifié. Nous pouvons assimiler ce résultat à l'absence d'expression de *CYP82D64* dans l'albédo du pomelo mûr. Dans la pulpe, les quantités de *CYP82D64* présentes sont divisées par environ 2,3 entre le jeune fruit et le fruit à un stade intermédiaire et par plus de 18 entre le stade intermédiaire et le fruit mûr (figure 54).

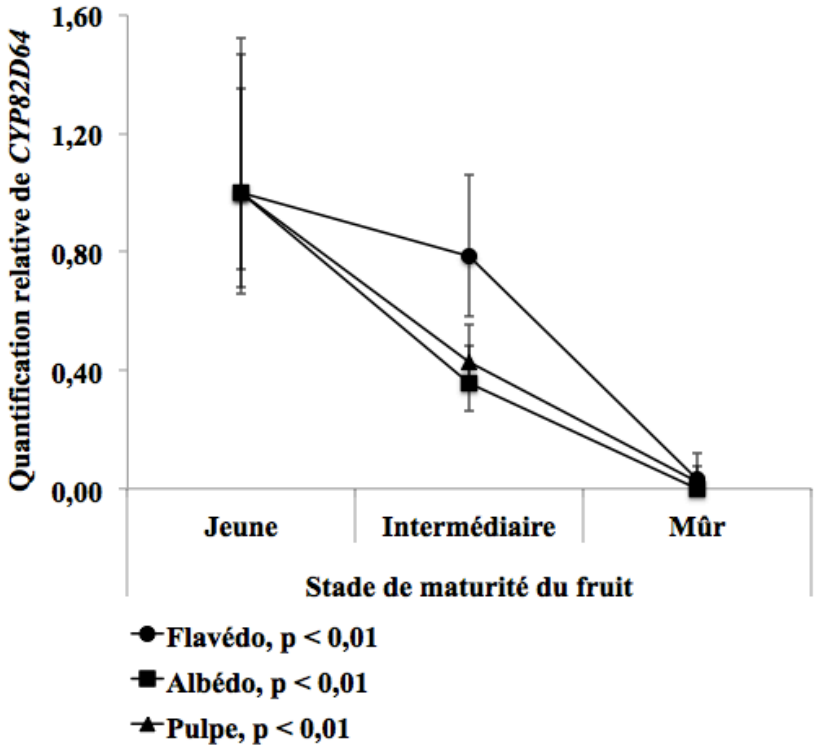


Figure 54. Quantification relative de *CYP82D64* de pomelo Ruby dans différents tissus du fruit à différents stades de maturité.

La quantification relative a été effectuée en comparaison avec le niveau d'expression stable du gène EF1. Les analyses ont été faites en triplicats. Des tests ANOVA ont permis de mettre en évidence des niveaux d'expression de *CYP82D64* significativement différents ($p < 0,01$) au cours du développement du fruit, que ce soit pour le flavédo, l'albédo ou la pulpe.

3.1.3.2 Production de coumarines et de furocoumarines chez le pomelo Ruby

En parallèle de l'étude du niveau d'expression de *CYP82D64* de pomelo Ruby dans différents tissus du fruit et à différents stades de maturité, j'ai également effectué des analyses phytochimiques sur ces mêmes échantillons. Pour cela, j'ai utilisé la méthode de quantification en UPLC-MS de 28 coumarines et furocoumarines décrite dans la première partie de ce chapitre, pour étudier la peau (flavédo et albédo séparés) et la pulpe du pomelo Ruby. Les résultats de quantification complets sont présentés dans l'annexe 11. De même que pour le niveau d'expression de *CYP82D64*, les teneurs en coumarines et furocoumarines dans le flavédo, l'albédo et la pulpe diminuent fortement au cours du développement du fruit

(figure 55). Chez le jeune fruit, la pulpe est la plus forte productrice de composés, suivie de près par le flavédo, puis par l'albédo. Les fruits à un stade intermédiaire et mûrs montrent de plus fortes concentrations en coumarines et furocoumarines dans le flavédo, suivi par la pulpe et par l'albédo. Les concentrations moyennes en coumarines et furocoumarines dans le flavédo sont divisées par près de 1,5 entre le jeune fruit et le fruit à un stade intermédiaire et par plus de 2,5 entre le stade intermédiaire et le fruit mûr (figure 55-A). Dans l'albédo, lors du passage de jeune fruit au stade intermédiaire puis au fruit mûr, les concentrations en coumarines et furocoumarines moyennes sont divisées par près de 2 puis 3 respectivement (figure 55-B). Dans la pulpe, les teneurs moyennes en composés sont divisées par 2,5 puis 7,4 lors du passage de jeune fruit au stade intermédiaire puis du stade intermédiaire au fruit mûr respectivement (figure 55-C). Les concentrations moyennes en coumarines et furocoumarines diminuent donc plus fortement dans la pulpe que dans la peau (flavédo et albédo) au cours de la maturation.

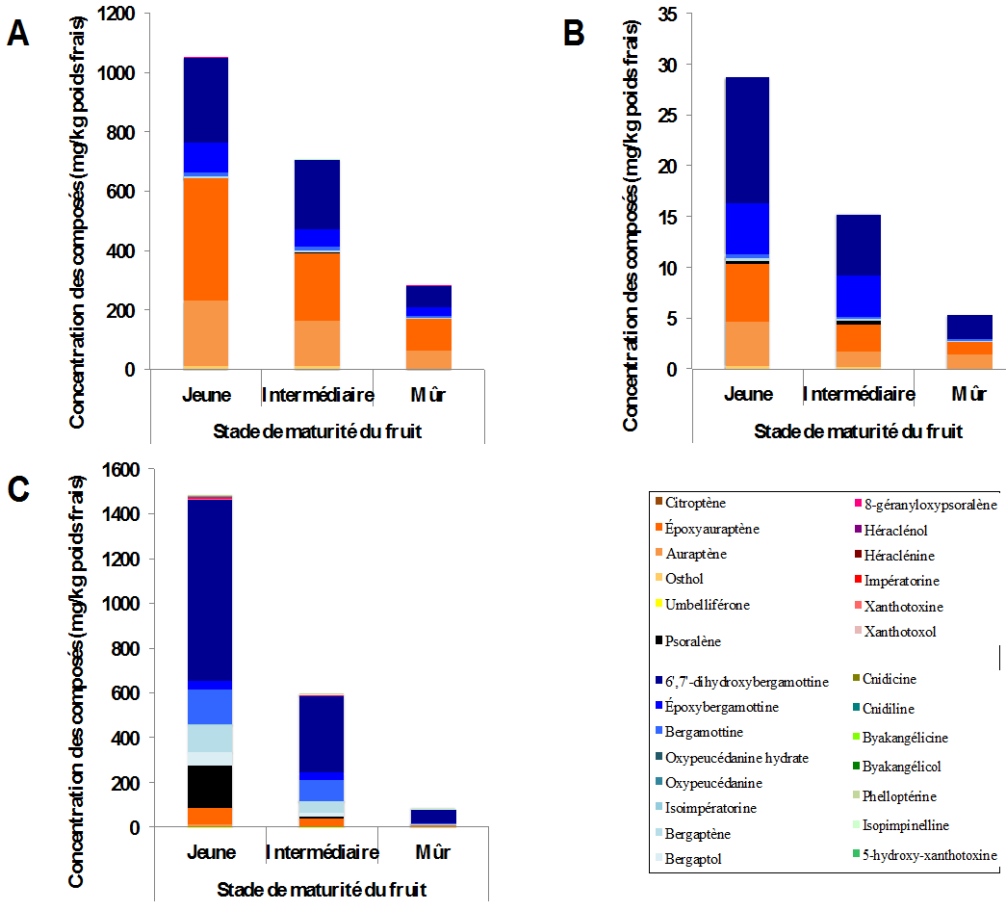


Figure 55. Concentration moyenne (mg/kg poids frais) des coumarines et furocoumarines dans différents tissus de fruits de pomelo Ruby à différents stades de maturité.

Les analyses ont été faites en triplicats. (A) Extraits de flavédo ; (B) Extraits d'albédo ; (C) Extraits de pulpe.

De même que lors du chémotypage des 62 variétés d'agrumes précédemment étudiées, nous pouvons observer que le pomelo Ruby produit principalement des coumarines géranylées (auraptène, époxyauraptène) et des furocoumarines géranylées en position 5 (groupe du bergaptène) : bergamottine, époxybergamottine et 6',7'-dihydroxybergamottine (figure 55). Cependant, les profils métaboliques observés sont légèrement différents entre les différents tissus. Le flavédo et l'albédo sont majoritairement composés des coumarines et furocoumarines précédemment citées (figure 55-A et B). La pulpe contient ces mêmes molécules, mais produit en supplément de grandes quantités de furocoumarines à structure « basique » comme le psoralène (pas de substitution particulière), le bergaptol (hydroxylation en position 5) et le bergaptène (méthoxylation en position 5) (figure 55-C).

Le pomelo produisant majoritairement des furocoumarines du groupe du bergaptène, j'ai décidé de représenter l'évolution de la concentration en xanthotoxine et en 5-hydroxy-xanthotoxine (groupe de l'isopimpinelline) dans le flavédo, l'albédo et la pulpe au cours du développement du fruit, sur des graphiques séparés. Le flavédo et l'albédo du pomelo Ruby ne contiennent aucune trace de xanthotoxine ou de 5-hydroxy-xanthotoxine, quel que soit le stade de maturité étudié (figures 56 et 57 respectivement).

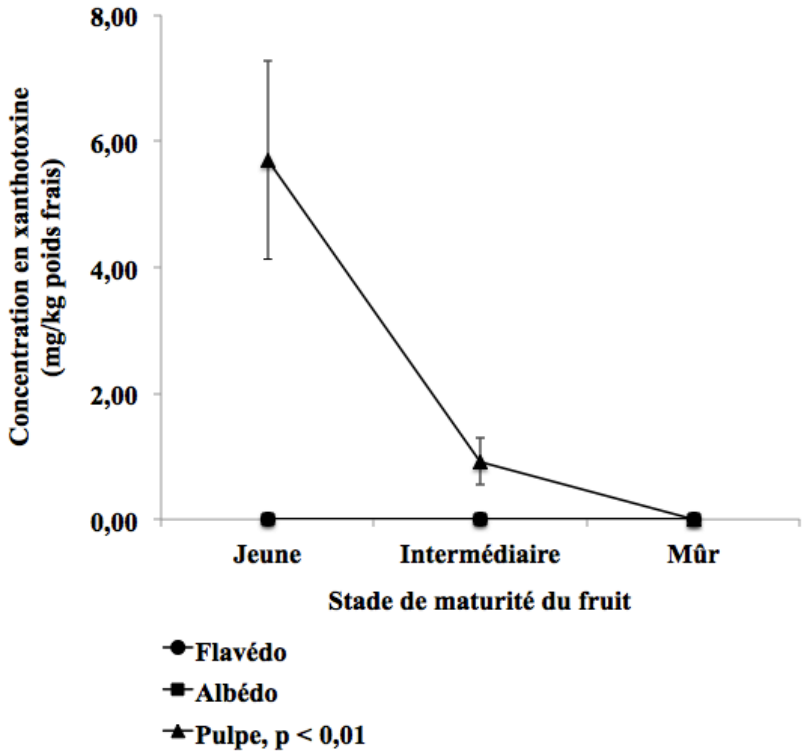


Figure 56. Concentration moyenne (mg/kg poids frais) en xanthotoxine dans différents tissus de fruits de pomelo Ruby à différents stades de maturité.

Les analyses ont été faites en triplicats. Des tests ANOVA ont permis de mettre en évidence des teneurs en xanthotoxine significativement différentes ($p < 0,01$) dans la pulpe au cours du développement du fruit.

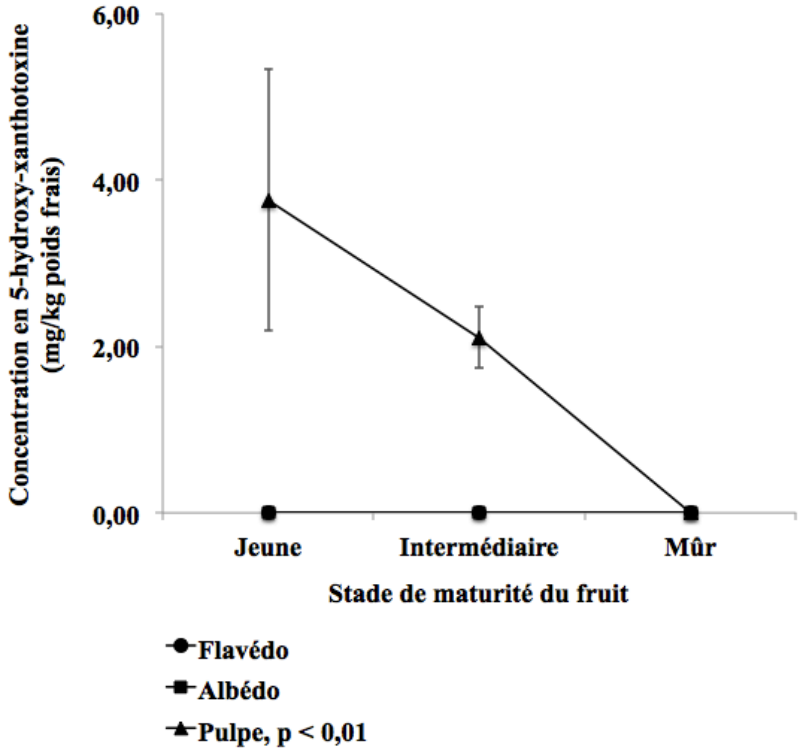


Figure 57. Concentrations moyennes (mg/kg de poids frais) en 5-hydroxy-xanthotoxine dans différents tissus et à différents stades de maturité de fruits de pomelo Ruby.

Les analyses ont été faites en triplicats. Des tests ANOVA ont permis de mettre en évidence des teneurs en 5-hydroxy-xanthotoxine significativement différentes ($p < 0,01$) dans la pulpe au cours du développement du fruit.

En revanche, la pulpe contient ces deux furocoumarines et de même que pour les autres coumarines et furocoumarines, les teneurs en xanthotoxine et 5-hydroxy-xanthotoxine diminuent de manière significative dans ce tissu au fur et à mesure de la maturité du fruit (figures 56 et 57 respectivement). La concentration moyenne en xanthotoxine dans la pulpe est divisée par plus de 6 entre le jeune fruit et le stade intermédiaire et le fruit mûr n'en produit plus (figure 56). La concentration moyenne en 5-hydroxy-xanthotoxine dans la pulpe est divisée par 1,8 entre le jeune fruit et le stade intermédiaire et cette molécule n'est plus que détectable dans le fruit mûr (figure 57).

Les analyses réalisées *in vivo* mettent en évidence une corrélation entre l'expression de *CYP82D64* de pomelo Ruby et la production de coumarines et furocoumarines (en particulier de 5-hydroxy-xanthotoxine dans la pulpe). Cependant, ces analyses ne permettent pas de conclure quant au rôle essentiel de cette enzyme dans la production de ces composés.

3.2 Identification et étude de cytochromes P450 de la sous-famille CYP71CE chez les *Citrus*

3.2.1 Clonage des séquences codantes

Un autre gène candidat pointé dans le cadre des travaux de Master de Victoire Coqueret est le gène d'orange douce nommé *orange1.1g048790*, qui s'est vu attribuer le nom de *CYP71CE1*. Ce gène est homologue aux gènes *CYP71AJ3* et *CYP71AJ4* de panais (42,2 % d'identité protéique avec CYP71AJ3 et 39,9 % avec CYP71AJ4) correspondant à la psoralène synthase et à l'angélicine synthase respectivement (Larbat *et al.*, 2009). Pour cloner la séquence codante de *CYP71CE1*, j'ai effectué des extractions d'ARN totaux de peau et de feuilles de Combava (*C. hystrix*) et de pomelo Ruby (*C. paradisi*) et de peau, de feuilles et de pulpe d'orange douce (*C. sinensis*), provenant du jardin botanique de Villers-Lès-Nancy. J'ai ensuite préparé les échantillons d'ADNc afin d'amplifier le gène *CYP71CE1* avec les amorces créées par Victoire Coqueret (tableau 25). De même que précédemment, l'amorce antisens a été modifiée de façon à ce que la protéine codée par le gène présente une queue poly histidines artificielle, détectable par Western Blot (cf. section « Matériel et méthodes »).

Amorces	Séquences
orange1.1g048790 dir	5' ATGATTTCTCAATTTTTCTTCCTTCTCTTGTTAATTACAACCTCAT 3'
orange1.1g048790 rev	5' TTAATGATGATGATGATGATGGAGACTAGGCAAAGAGGA 3'

Tableau 25. Amorces utilisées pour l'amplification de séquences codantes d'agrumes correspondant au gène *CYP71CE1* d'orange douce.

Le codon initiateur est indiqué en bleu et le codon stop en rouge. La séquence correspondant à la queue poly histidines composée de 6 histidines est indiquée en vert. Pour information, l'hybridation des amorces est réalisée à 50 °C lors des 5 premiers cycles et 60 °C lors des 35 cycles suivants.

Avant d'effectuer les clonages, je me suis assurée qu'il n'y avait plus d'ADNg dans les échantillons d'ARN d'agrumes. Pour cela, j'ai effectué des PCR sur des échantillons d'ADNg d'orange douce et de pomelo Ruby et sur les échantillons d'ARN et d'ADNc utilisés pour l'amplification de *CYP71CE1* chez ces mêmes agrumes. L'amplification de fragments d'ADN d'une taille d'environ 1500 pb dans les échantillons d'ADNg et d'ADNc d'orange douce (figure 58-A, puits 1 et 3 respectivement) et de pomelo Ruby (figure 58-B, puits 1 et 3 respectivement) et au contraire l'absence d'amplification d'ADN dans les échantillons d'ARN d'orange douce (figure 58-A, puits 2) et de pomelo Ruby (figure 58-B, puits 2) montre que la digestion à la DNase après les extractions d'ARN a bien fonctionné.

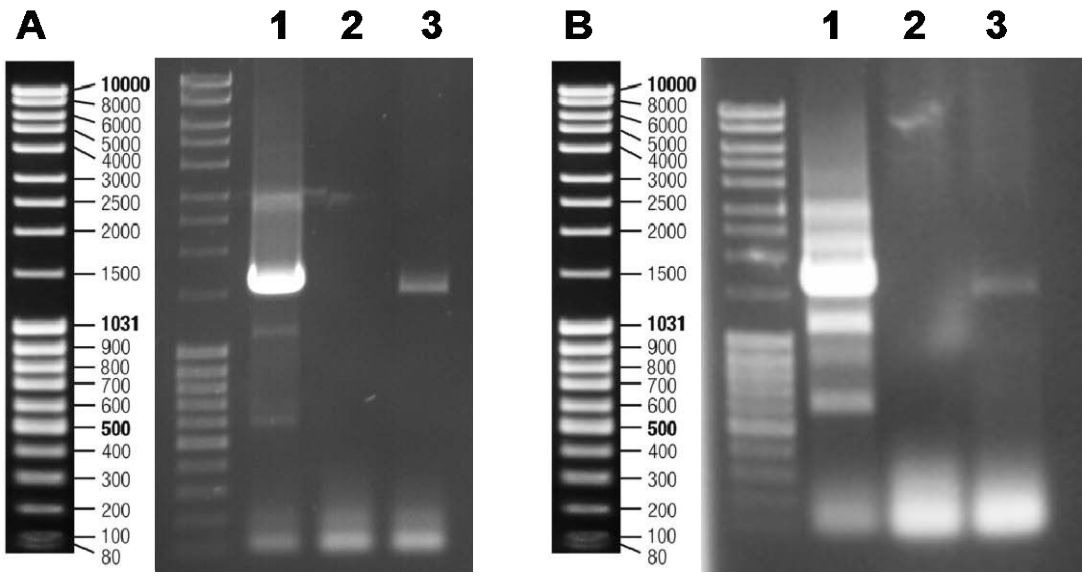


Figure 58. Vérification de l'absence de séquence d'ADNg du gène *CYP71CE1* dans les échantillons d'ARN d'orange douce et de pomelo Ruby.

1 = ADNg ; 2 = ARN ; 3 = ADNc ; (A) Échantillons de peau d'orange douce ; (B) Échantillons de feuilles de pomelo Ruby.

Suite à cette vérification, j'ai cloné les fragments d'ADNc d'orange douce et de pomelo Ruby amplifiés dans le vecteur pCR®8/GW et je les ai fait séquencer (annexe 12). Les résultats de séquençage ont confirmé le clonage de fragments d'ADN homologues à *CYP71CE1*, chez l'orange douce et chez le pomelo Ruby. L'analyse des séquences a cependant révélé plusieurs différences avec la matrice disponible dans la base de données Phytozome, malgré les nombreuses répétitions du clonage. L'analyse *in silico* de la séquence codante de *CYP71CE1* sur Phytozome prédit la présence de deux introns (un de 49 pb et un de 82 pb). Les différents clonages que j'ai effectués ont abouti à des séquences d'ADNc ayant gardé le premier intron prédit pour l'orange douce et pour le pomelo (figure 59).

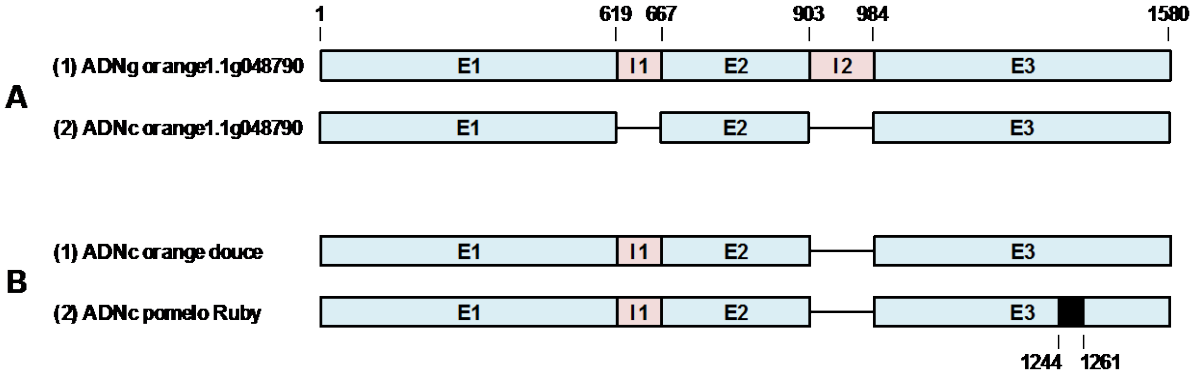


Figure 59. Distribution des exons et des introns dans la séquence codante de *CYP71CE1*.

Les exons sont représentés en bleu (E) et les introns en rose (I). (A) Distribution prédite dans la base de données Phytozome chez l'orange douce ; (1) Séquence d'ADNg, (2) Séquence d'ADNc. (B) Séquences d'ADNc réellement obtenues lors du clonage de *CYP71CE1* chez l'orange douce (1) et chez le pomelo Ruby (2). Chez le pomelo Ruby, la délétion de 18 nt dans la séquence d'ADNc est représentée par un rectangle orange hachuré.

Pour tous les clonages réalisés à partir du pomelo Ruby, j'ai également mis en évidence une délétion de 18 nucléotides (nt) dans l'exon 3, qui n'est pas présente chez l'orange douce (figure 59).

Les ARN issus du gène *CYP71CE1* chez l'orange douce et le pomelo Ruby conservent donc le premier intron. Ainsi, contrairement à la séquence d'ARNm prédite par le site web Phytozome (figure 60-A), l'intron conservé dans les ARNm d'orange douce et de pomelo Ruby provoque un changement dans le cadre de lecture à partir de cet intron (figure 60-B). Un codon stop UGA apparaît alors quelques dizaines de nucléotides après l'intron conservé (figure 60-B), ce qui lors de la traduction est à l'origine d'une protéine raccourcie (231 acides aminés au lieu de 482) et donc non fonctionnelle.

Figure 60. Changement du cadre de lecture de *CYP71CE1* d'orange douce et de pomelo Ruby conduisant au raccourcissement de la protéine correspondante.

L'intron prédit dans la base de données Phytozome est indiqué en rose. Un codon sur deux est surligné en bleu afin d'identifier le cadre de lecture de la séquence d'ARNm. (A) Séquence d'ARNm issue du gène *CYP71CE1* d'orange douce prédite dans la base de données Phytozome : l'intron surligné en vert est absent dans la séquence d'ARNm. (B) Séquence d'ARNm réellement présente dans les échantillons d'orange douce et de pomelo Ruby : l'intron est conservé, le cadre de lecture change aboutissant à un codon stop UGA en position 694 et donnant lieu à une protéine raccourcie de 231 acides aminés lors de la traduction.

De la même manière, la délétion de 18 nt dans les ARNm de pomelo Ruby entraîne l'apparition d'un codon stop UAA dans la séquence et est à l'origine d'une protéine raccourcie (370 acides aminés au lieu de 482 acides aminés) et donc non fonctionnelle.

Afin de nous assurer que le clonage de la séquence codante de *CYP71CE1* partiellement épissée n'était pas un artéfact, j'ai réalisé des PCR avec des amorces s'hybridant de part et d'autre du premier intron (tableau 26).

Amorces	Séquences
CYP71CE1 intron dir	5' CGGATATGATTAAGATCATAGCTCGATCAT 3'
CYP71CE1 intron rev	5' ATATTTCTTCATCATAAATCTGTCAAGTTCTC 3'

Tableau 26. Amorces utilisées pour l'amplification de la séquence codante de *CYP71CE1* d'orange douce et de pomelo Ruby autour du premier intron.

J'ai créé ces amorces de sorte que s'il existe deux formes de l'ARNm de *CYP71CE1* d'orange douce et de pomelo Ruby, à savoir une conservant le premier intron et la seconde étant entièrement épissée, les PCR réalisées fassent apparaître deux bandes lors de la migration sur gel d'agarose à 2 %. La première d'une taille de 301 nt correspondrait à l'ADNc ayant conservé l'intron, tandis que la seconde d'une taille de 252 nt correspondrait à l'ADNc n'ayant pas conservé l'intron de 49 nt (figure 61-A). Les résultats des PCR effectuées sur les échantillons d'ADNc de peau d'orange douce et de feuilles de pomelo Ruby n'ont permis d'identifier qu'une seule bande aux alentours de 300 nt (figure 61-B et C respectivement, puits 1), laissant penser que l'intron 1 de *CYP71CE1* n'est jamais épissé chez ces agrumes.

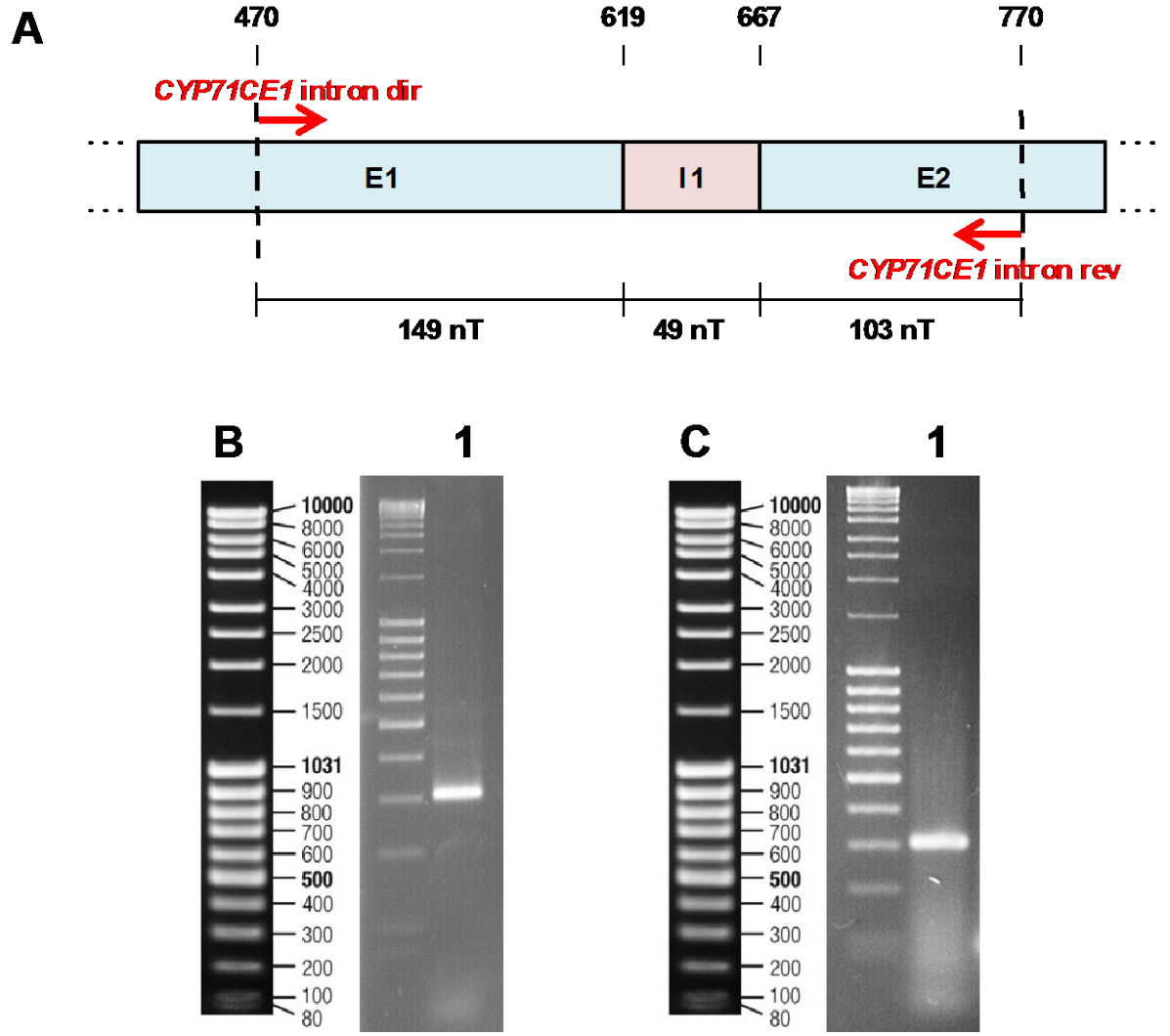


Figure 61. Vérification de l'épissage de l'intron 1 de *CYP71CE1* chez l'orange douce et le pomelo Ruby.

(A) Détail de la position des amorces créées (flèches rouges) dans les exons 1 et 2 autour de l'intron 1. (B) PCR réalisée sur l'ADNc de peau d'orange douce avec les amorces *CYP71CE1* intron dir et rev décrites précédemment. (C) PCR réalisée sur l'ADNc de feuilles de pomelo Ruby avec les amorces *CYP71CE1* intron dir et rev décrites précédemment (tableau 26). Pour information, la PCR est composée de 35 cycles dont l'étape d'hybridation des amorces est réalisée à 54 °C.

Les résultats obtenus jusque-là semblent donc indiquer que *CYP71CE1* d'orange douce et de pomelo Ruby soient des pseudogènes, c'est-à-dire des gènes inactifs dans le génome, ne conduisant pas à l'expression d'une protéine fonctionnelle. Cependant, les conditions expérimentales mises en œuvre ne permettent pas de conclure définitivement sur cette hypothèse. Il est en effet possible que les ARNm soient épissés de manière alternative, mais que seule une très faible proportion soit épissée correctement.

Une manière de contourner ce problème consiste à modifier les conditions expérimentales en utilisant des amorces s'hybridant à cheval sur deux exons à chaque fois (exons 1 et 2 ou exons 2 et 3), avec environ 25 nt s'hybridant dans le premier exon et 5 nt s'hybridant dans l'exon suivant dans le sens 5'-3' (tableau 27 et figure 62-A). En créant ces quatre amorces, j'ai fait en sorte que le dernier nucléotide choisi (faisant partie des 5 nt s'hybridant sur le deuxième exon) soit différent du cinquième nucléotide de l'intron (dans le sens 5'-3') présent entre les deux exons ciblés. De cette manière, l'amorce ne devait normalement pas s'hybrider dans l'intron suivant le premier exon ciblé dans le sens 5'-3'.

Amorces	Séquences
CYP71CE1 E1-E2 dir	5' GATACTGGGACAACGGGGTTTGATATTTTT 3'
CYP71CE1 E2-E3 dir	5' TGAACAAATCAAGAGCCTCCTCACGGACAT 3'
CYP71CE1 E1-E2 rev	5' AGCCATCCCATCCAGGGAAAAAAAATATCA 3'
CYP71CE1 E2-E3 rev	5' TATCGGTCCCCGCAACAAATATGTCCGTGA 3'

Tableau 27. Amorces utilisées pour vérifier l'épissage des deux introns de l'ARNm de *CYP71CE1* à partir des ADNc d'orange douce et de pomelo Ruby.

Le programme 1 de PCR utilisé pour les PCR avec les amorces en rouge et vert sur la figure 62 était composé de 35 cycles : 95 °C, 20 sec ; 54 °C, 15 sec ; 72 °C, 2 min. Le programme 2 de PCR utilisé pour la PCR avec les amorces en bleu sur la figure 62 était composé de 5 cycles : 95 °C, 20 sec ; 50 °C, 15 sec ; 72 °C, 2 min, permettant l'hybridation de l'amorce reverse sans la séquence correspondant à la queue poly histidines et de 35 cycles supplémentaires : 95 °C, 20 sec ; 60 °C, 15 sec ; 72 °C, 2 min, permettant l'amplification de la séquence cible avec l'intégration de la séquence correspondant à la queue poly histidines. Pour chacun des programmes, j'ai effectué des contrôles positifs en réalisant l'amplification de *CYP71CE1* en entier avec les amorces décrites dans le tableau 25.

Pour les échantillons d'ADNc de peau d'orange douce et de feuilles de pomelo Ruby, nous observons des amplifications uniquement pour les contrôles positifs et pour les PCR réalisées avec les amorces indiquées en bleu dans la figure 62-A (figure 62-B et C respectivement, puits 1, 2 et 4). Les amplifications obtenues avec les amorces indiquées en bleu dans la figure 62-A concordent avec les résultats de séquençage obtenus, à savoir que l'intron 2 est bien épissé dans la peau d'orange douce et les feuilles de pomelo Ruby. Par ailleurs, l'absence d'amplification dans ces mêmes échantillons avec les amorces indiquées en rouge et en vert (figure 62-B et C, puits 3 et 5 respectivement), spécifiques des ADNc correspondant à des ARN de *CYP71CE1* entièrement épissés (figure 62-A), semble indiquer que l'intron 1 présent dans les ARN de *CYP71CE1* de peau d'orange douce et de feuilles de

pomelo Ruby, n'est jamais épissé. Pourtant, cet intron possède bien les signaux canoniques d'épissage chez les eucaryotes en 5' (GT sur l'ADNg, soit GU sur l'ARNm) et 3' (AG sur l'ADNg et l'ARNm) (Shapiro et Senapathy, 1987) (figure 60). En conséquence, *CYP71CE1* dans la peau d'orange douce et *CYP71CE1* dans les feuilles de pomelo Ruby sont vraisemblablement des pseudogènes.

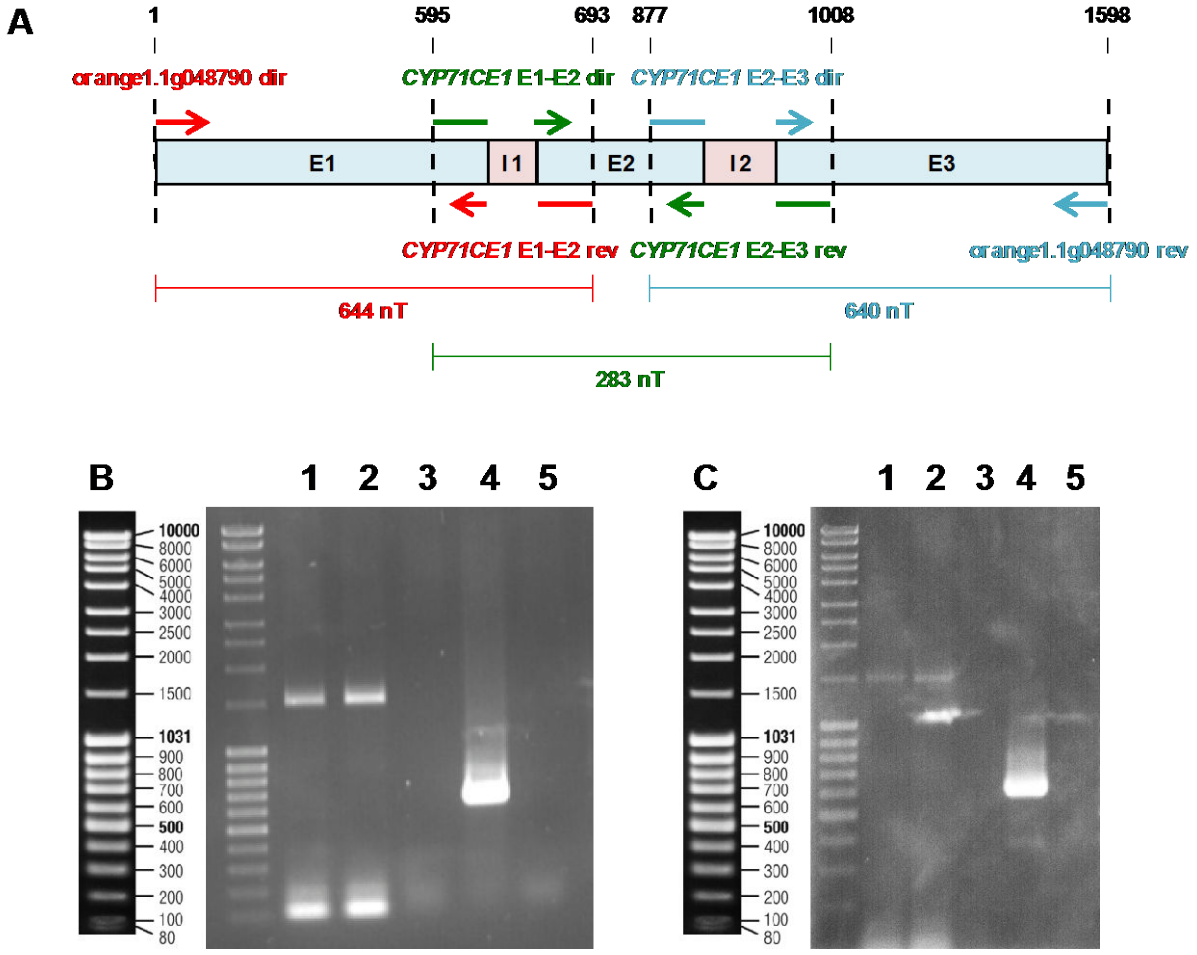


Figure 62. Vérification de l'épissage des introns de *CYP71CE1* chez l'orange douce et le pomelo Ruby.

(A) Détail de la position des couples d'amorces (flèches rouges, vertes et bleues) en fonction de la distribution des exons/introns dans *CYP71CE1* ; (B) PCR réalisées sur l'ADNc de peau d'orange douce ; (C) PCR réalisées sur l'ADNc de feuilles de pomelo Ruby. 1 et 2 = contrôles positifs (*CYP71CE1* entièrement amplifiés par les amorces du tableau 25 et avec les programmes 2 et 1 respectivement) ; 3 = PCR réalisées avec les amorces indiquées en rouge sur la figure 62-A ; 4 = PCR réalisées avec les amorces indiquées en bleu sur la figure 62-A ; PCR réalisées avec les amorces indiquées en vert sur la figure 62-A.

3.2.2 Tentative d'expression hétérologue de *CYP71CE1* d'orange douce dans la levure

L'épissage du premier intron de *CYP71CE1* ne se fait pas chez l'orange douce et le pomelo, dans les conditions testées, malgré les signaux canoniques d'épissage. Il est cependant possible que cette excision se fasse dans d'autres conditions, comme par exemple

dans un système levure. Pour le vérifier, j'ai sous-cloné la séquence codante de *CYP71CE1* d'orange douce dans le vecteur pYeDP60_GW® par LR-recombinaison. Je n'ai pas effectué cette démarche pour *CYP71CE1* de pomelo étant donné que la délétion de 18 nt dans l'exon 3 entraîne l'apparition d'un codon stop et le raccourcissement de la protéine correspondante.

Des expérimentations visant à produire la protéine CYP71CE1 d'orange douce dans la levure ont été réalisées en parallèle de l'expression de CYP82D64 de Combava (témoin positif). Le témoin négatif correspond aux levures transformées avec le vecteur vide. J'ai ensuite vérifié l'expression des protéines par des approches d'immunodétection. Le Western-Blot n'a pas permis de visualiser de bande pour l'échantillon de microsomes préparés à partir de levures transformées par *CYP71CE1* d'orange douce (figure 63, puits 3). De même, aucune bande n'est visible pour les protéines contenues dans l'échantillon de microsomes de levures transformées par le vecteur vide (figure 63, puits 1). En revanche, nous observons bien une bande pour le contrôle positif (CYP82D64 de Combava), ce qui indique que le Western Blot a bien fonctionné (figure 63, puits 2). Nous pouvons donc faire l'hypothèse que l'intron conservé dans la séquence d'ADNc de *CYP71CE1* d'orange douce n'a pas été excisé dans la levure non plus. S'il y a tout de même eu transcription puis traduction de la séquence d'intérêt, il est probable que la protéine raccourcie et non fonctionnelle ait été dégradée. Pour vérifier si *CYP71CE1* a été transcrit, il faudrait effectuer une extraction d'ARN de levures, suivie d'une digestion d'ADN, d'une transcription inverse et d'une PCR sur le gène cible. Faute de temps, je n'ai pas pu faire cette vérification.

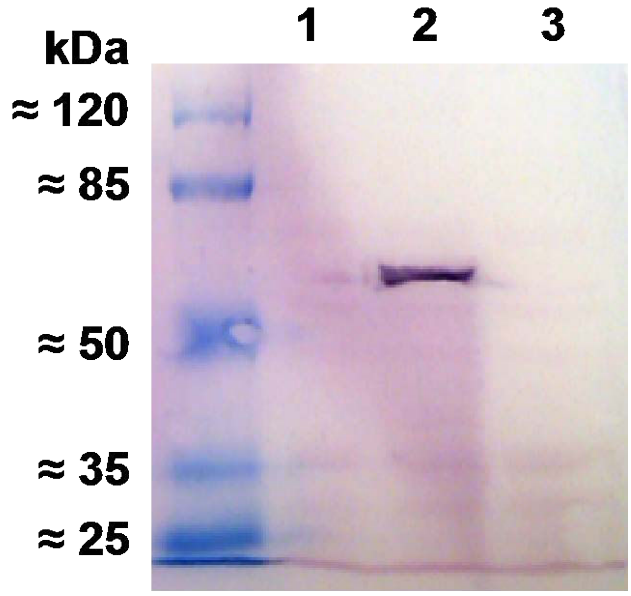


Figure 63. Mise en évidence de l'absence de production de CYP71CE1 chez la levure par Western-Blot.

(1) Contrôle négatif (vecteur pYeDP60_GW® vide) ; (2) Contrôle positif (CYP82D64 de Combava) ; (3) CYP71CE1 d'orange douce. Le marqueur de poids moléculaire à gauche permet d'estimer la taille des protéines recombinantes produites.

Un deuxième gène (*CYP71CE1*) a été identifié comme étant potentiellement impliqué dans la synthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes. Plusieurs tentatives de clonage ont mené à l'identification d'ARNm partiellement épissés (premier intron conservé). Des expérimentations complémentaires m'ont permis de comprendre que dans les conditions testées, *CYP71CE1* d'orange douce et de pomelo Ruby ne sont jamais entièrement épissés, ce qui conduit à l'expression de protéines raccourcies et non fonctionnelles. Les gènes *CYP71CE1* d'orange douce et de pomelo Ruby sont donc vraisemblablement des pseudogènes.

3.3 Identification de cytochromes P450 des sous-familles CYP82C et CYP71AN chez les Citrus

Les deux derniers gènes candidats à la synthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes retenus par Victoire Coqueret lors de son stage de Master étaient *Ciclev10028201* (nommé *CYP82C46*) et *Ciclev10018132* (nommé *CYP71AN25*). Les deux paragraphes suivants résument les travaux que j'ai menés sur ces deux gènes.

3.3.1 Clonage de *CYP82C46*

Le gène *Ciclev10028201* ou *CYP82C46* est un gène homologue aux *CYP82C* d'*A. thaliana* (58,0 % d'identité protéique avec CYP82C2 et 58,4 % d'identité protéique avec CYP82C4). Pour cloner la séquence codante de *CYP82C46*, je l'ai d'abord amplifiée par PCR à partir d'échantillons d'ADNc, eux-mêmes dérivant d'échantillons d'ARN totaux de feuilles de lime Gallet (*C. aurantifolia*), de feuilles et de peau d'orange amère ou bigarade (*C. aurantium*) et de pomelo Ruby (*C. paradisi*) et de peau de Combava (*C. hystrix*). De même que précédemment, j'ai ajouté une séquence de 18 nt correspondant à une queue poly histidines sur l'amorce antisens du gène, afin de pouvoir visualiser la protéine exprimée par Western Blot (tableau 28).

Amorces	Séquences
Ciclev10028201 dir	5' ATGGAATTCTCCCTTCAGCTTCAAGCAATCATATGCTTC 3'
Ciclev10028201 rev	5' TCAATGATGATGATGATGATGAACATATAGCTTGGAAGGCAGT 3'

Tableau 28. Amorces utilisées pour l'amplification de séquences codantes d'agrumes correspondant au *Ciclev10028201* de clémentine.

Le codon initiateur est indiqué en bleu et le codon stop en rouge. La séquence correspondant à la queue poly histidines composée de 6 histidines est indiquée en vert. Pour information, l'hybridation des amorces est réalisée à 54 °C lors des 5 premiers cycles et à 62 °C lors des 35 cycles suivants.

J'ai pu amplifier des fragments d'ADN d'environ 1500 pb pour les échantillons de feuilles de bigarade et de pomelo Ruby. Je les ai ensuite clonés et faits séquencer. Les résultats de séquençage ont confirmé le clonage d'une séquence d'ADNc homologue au *CYP82C46* de clémentine pour les échantillons préparés à partir de feuilles de bigarade

(annexe 13). J'ai donc sous-cloné cette séquence codante dans le vecteur pYeDP60_GW® par LR-recombinaison, afin de pouvoir exprimer la protéine correspondante chez la levure. Pour vérifier si l'enzyme CYP82C46 de bigarade a bien été produite, j'ai préparé des microsomes de levures que j'ai analysé par SDS-PAGE suivi d'un Western-Blot. Lors de ces expérimentations, j'ai également utilisé des microsomes de levures transformées par le vecteur pYeDP60_GW® vide (contrôle négatif, figure 64, puits 1) et par le vecteur pYeDP60_GW®-*CYP82D64* de Combava (contrôle positif). Si une bande peut être mise en évidence pour le témoin positif CYP82D64 (figure 64, puits 2), je n'ai pas pu détecter la protéine correspondant à CYP82C46 (figure 64, puits 3). Pour vérifier si l'absence de protéine était due à la colonie de levures choisie lors de la mise en culture, j'ai de nouveau préparé des microsomes à partir d'une deuxième colonie de levures transformées par pYeDP60_GW®-*CYP82C46*. Cependant, je n'ai pas pu détecter non plus la présence de CYP82C46 dans les microsomes (figure 64, puits 4).

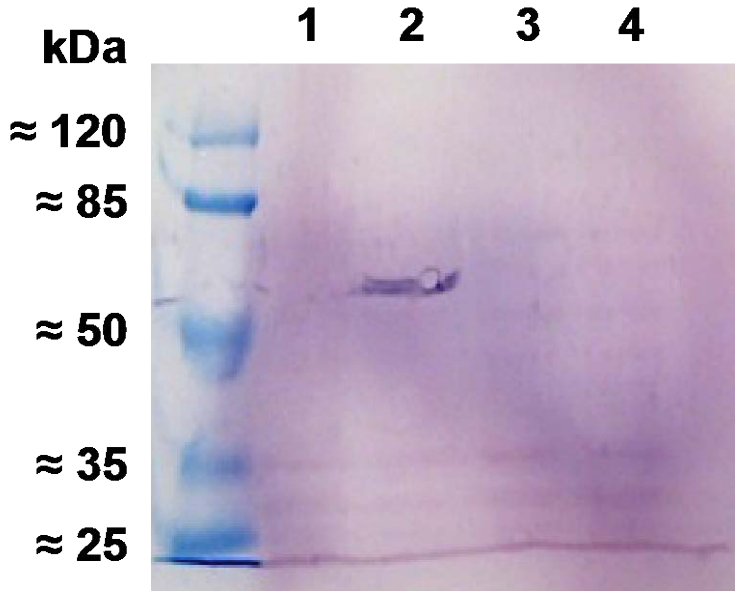


Figure 64. Mise en évidence de l'absence de production de CYP82C46 chez la levure par Western-Blot.

(1) Contrôle négatif (vecteur vide) ; (2) Contrôle positif (CYP82D64 de Combava) ; (3) CYP82C46 de bigarade, première colonie testée ; (4) CYP82C46 de bigarade, seconde colonie testée. Le marqueur de poids moléculaire à gauche permet d'estimer la taille des protéines recombinantes produites.

Je peux donc conclure ici que la protéine CYP82C46 de bigarade n'était pas présente dans les échantillons de microsomes de levures transformées par le gène correspondant. Je peux formuler les hypothèses suivantes : soit la protéine n'a pas été produite par les levures, soit elle a bien été produite, mais elle a ensuite subit une dégradation nous empêchant de la visualiser lors du Western-Blot.

3.3.2 Clonage de *CYP71AN25*

Le gène de clémentine *Ciclev10018132* faisait partie des gènes candidats retenus par Victoire Coqueret lors de son stage de Master au sein de notre laboratoire. Il a été nommé CYP71AN25 et présente des homologies avec les CYP71AJ de panais (43,5 % d'identité protéique avec CYP71AJ3 et 43,3 % d'identité protéique avec CYP71AJ4). Pour pouvoir le cloner, j'ai réalisé des extractions d'ARN totaux de feuilles de lime Gallet (*C. aurantifolia*), de peau d'orange amère (*C. aurantium*) et de Combava (*C. hystrix*), de feuilles et de peau de pomelo Ruby (*C. paradisi*) et de petits fruits de bergamote (*C. bergamia*). J'ai ensuite préparé des échantillons d'ADNc et j'ai essayé d'amplifier par PCR la séquence codante de *CYP71AN25* avec les amorces créées par Victoire Coqueret (tableau 29).

Amorces	Séquences
Ciclev10018132 dir	5' ATGGCTCTGCCATTAGTCTTGATGAAGCAATTGCAG 3'
Ciclev10018132 rev	5' TCAATGATGATGATGATGATGATGAGGAGAGTACACAGTTGG 3'
Ciclev10018132 amplicon dir	5' TTAACGTACATGGAGGATC 3'
Ciclev10018132 amplicon rev	5' CTTCTTCATCTTCAACCTTC 3'

Tableau 29. Amorces utilisées pour l'amplification totale ou partielle du gène Ciclev10018132 chez différentes variétés d'agrumes.

Le codon initiateur est indiqué en bleu et le codon stop en rouge. La séquence correspondant à la queue poly histidines composée de 6 histidines est indiquée en vert. Pour information, l'hybridation des amorces est réalisée à 56 °C lors des 5 premiers cycles et à 62 °C lors des 30 cycles suivants.

Malgré le nombre de variétés d'agrumes utilisées et les deux ADN polymérases testées (PrimeSTAR® Max et KAPA3G), je n'ai jamais réussi à amplifier la séquence codante de *CYP71AN25*. Pourtant, je n'ai eu aucun problème pour amplifier de façon totale ou partielle (cf. amorces du tableau 29) ce gène sur un échantillon d'ADNg de peau de pomelo Ruby (figure 65), ce qui montre que l'absence d'amplification n'est pas due aux amorces ou aux programmes utilisés.

Du fait de l'absence d'amplification du gène *CYP71AN25* par PCR, je n'ai pas pu effectuer son clonage, ni surexprimer la protéine correspondante afin de pouvoir réaliser des tests d'activité.

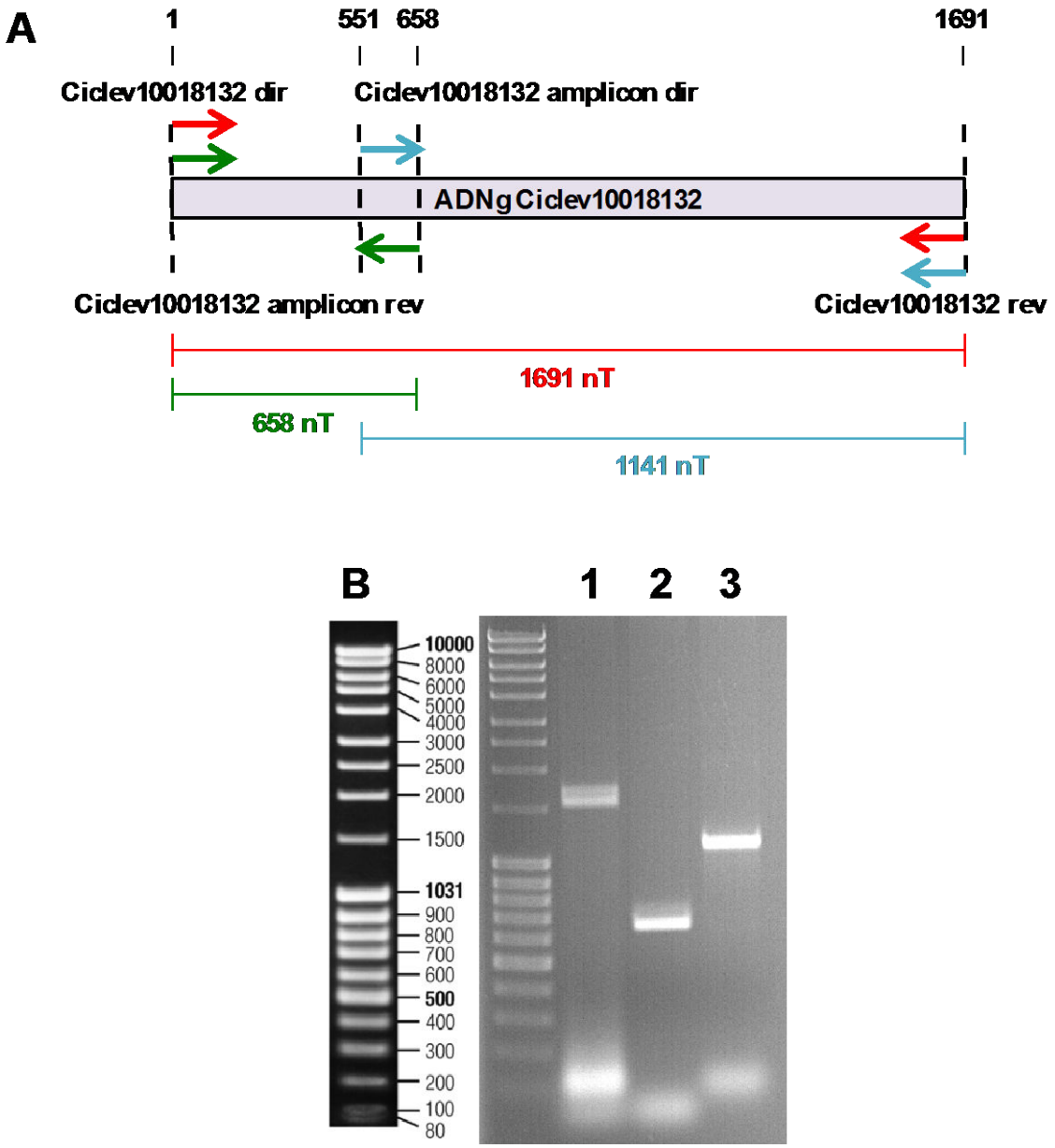


Figure 65. Amplification totale et partielle de la séquence génomique de *CYP71AN25* dans un échantillon d'ADNg de peau de pomelo Ruby.

(A) Détail de la position des couples d'amorces utilisés pour les amplifications (flèches rouges, vertes et bleues) ; (B) PCR réalisées sur l'échantillon d'ADNg de peau de pomelo Ruby. 1 = PCR réalisée avec les amorces indiquées en rouge sur la figure 65-A ; 2 = PCR réalisée avec les amorces indiquées en vert sur la figure 65-A ; 3 = PCR réalisée avec les amorces indiquées en bleu sur la figure 65-A.

3.4 Discussion

3.4.1 Étude comparative des *CYP82D64* de pomelo Ruby et de Combava

Suite au stage de Victoire Coqueret, qui avait comme objectif d'identifier des gènes candidats à la synthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes, j'ai essayé de cloner quatre séquences codantes retenues chez différentes variétés d'agrumes. Pour la

séquence codante *CYP82D64* identifiée chez la clémentine, j'ai réussi à isoler deux séquences codantes homologues à celle-ci chez le pomelo Ruby et chez le Combava. Elles présentent 97,6 % d'identité protéique (tableau 21) et sont donc issues d'une variation allélique.

Malgré cette forte similarité, les CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava présentent une activité légèrement différente. Alors que CYP82D64 de pomelo Ruby n'hydroxyle que la xanthotoxine en position 5 pour donner de la 5-hydroxy-xanthotoxine (figure 37), CYP82D64 de Combava est capable d'hydroxyler la xanthotoxine et l'herniarine en position 5, aboutissant respectivement à la 5-hydroxy-xanthotoxine et à la 5-hydroxy-7-méthoxycoumarine (figures 38 et 39 respectivement). Les divers Western Blot effectués sur les microsomes de levures transformées par ces deux séquences codantes, montrent à chaque fois que CYP82D64 de pomelo Ruby est moins concentré que CYP82D64 de Combava (figure 36). Il est donc possible que cette moindre concentration de CYP82D64 de pomelo Ruby empêche l'enzyme de métaboliser l'herniarine. Pour le savoir, il faudrait effectuer des incubations d'herniarine avec une même concentration de CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava. Par ailleurs, les constantes d'affinité *in vitro* relativement faibles de ces deux enzymes pour la xanthotoxine (4,6 et 7,4 µM pour CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava respectivement, tableau 22) montrent que cette furocoumarine est probablement un substrat naturel de ces cytochromes P450. Cependant, les quantités de 5-hydroxy-xanthotoxine formée étant relativement faibles, il est possible que les réactions effectuées par l'enzyme et la cytochrome P450 réductase ne soient pas couplées. Les quantités de 5-hydroxy-7-méthoxycoumarine produites par CYP82D64 de Combava en présence d'herniarine sont quant à elles tellement faibles, que je n'ai pas pu déterminer de constantes cinétiques. Ceci semble indiquer que l'herniarine n'est pas le substrat préférentiel de CYP82D64 de Combava et que l'activité observée n'est qu'opportuniste.

Pour mieux comprendre les différences d'activité observées chez ces deux cytochromes P450, j'ai pu obtenir leurs modèles tridimensionnels grâce à une collaboration avec Dave Ritchie et Bernard Maigret du LORIA. Lors de l'étude des constantes cinétiques des deux enzymes, j'ai pu observer que le K_m *in vitro* de CYP82D64 de pomelo Ruby pour la xanthotoxine est plus faible que celui de Combava. Ceci montre que CYP82D64 de pomelo Ruby présente une plus grande affinité pour son substrat que CYP82D64 de Combava (tableau 22). Ces résultats sont concordants avec les modélisations *in silico* qui montrent de fortes interactions entre la xanthotoxine et la poche catalytique de CYP82D64 de pomelo Ruby, notamment avec la lysine en position 512 (figure 52). Or pour CYP82D64 de Combava, cette lysine n'est pas située au niveau du site actif, mais l'espace est en partie comblé par l'arginine en position 518 et les interactions avec le substrat sont plus nombreuses (figure 52). Si l'affinité de CYP82D64 de pomelo Ruby pour la xanthotoxine est plus forte que celle de CYP82D64 de Combava, il est par contre possible que la constante catalytique k_{cat} soit plus élevée pour CYP82D64 de Combava. Je n'ai pas pu calculer ces constantes car pour cela, il est nécessaire de connaître les concentrations en CYP82D64 dans les échantillons de microsomes, données que je n'avais pas. En effet, pour obtenir les concentrations d'un cytochrome P450, il faut établir un spectre différentiel en présence de monoxyde de carbone permettant l'observation d'un pic d'absorption à 450 nm. Le problème est qu'en fonction des cytochromes P450 et de leur niveau d'expression, il n'est parfois pas possible d'observer un spectre avec cette technique. J'ai donc été contrainte de me passer des données de

concentrations d'enzyme, ainsi que des constantes catalytiques. Néanmoins, pour chaque incubation de CYP82D64 de Combava avec de la xanthotoxine, les quantités de 5-hydroxy-xanthotoxine formées étaient plus importantes qu'avec CYP8D64 de pomelo, pour un même temps d'incubation (comparer par exemple les figures 40 et 41 / 43 et 44 / 46 et 47). Il est possible qu'à chaque fois que j'ai préparé des microsomes, les quantités de protéines produites aient été plus importantes avec les levures transformées par le vecteur pYeDP60_GW®-*CYP82D64* de Combava. Cependant, il est aussi possible que CYP82D64 de Combava convertisse la xanthotoxine en 5-hydroxy-xanthotoxine de façon plus efficace. Concernant l'herniarine, il existe très peu d'interactions entre ce substrat et CYP82D64 de Combava au niveau du site actif de cette enzyme (figure 52). Ceci est en accord avec les observations expérimentales qui suggèrent une métabolisation opportuniste de ce substrat, du fait des très faibles quantités de produit formées. De la même manière, le modèle informatique de CYP82D64 de pomelo Ruby met en évidence des interactions uniquement hydrophobes avec l'herniarine au niveau de la poche catalytique de cette enzyme (figure 52). Il est donc probable que l'herniarine ne soit effectivement pas métabolisée par CYP82D64 de pomelo Ruby, même si cette enzyme était incubée avec ce substrat aux mêmes concentrations que CYP82D64 de Combava.

3.4.2 Évolution convergente des CYP82 et CYP71

Au sein du LAE, nous sommes plusieurs chercheurs à travailler sur la caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez différentes plantes. Celles pour lesquelles nos connaissances (en terme de gènes identifiés) sont les plus importantes, font partie de la famille des Apiacées. Plus particulièrement, de nombreux cytochromes P450 de la famille des CYP71 ont été caractérisés chez le panais (psoralène synthase : CYP71AJ3, angélicine synthase : CYP71AJ4, Larbat *et al.*, 2009 ; métabolisation de l'esculétine par CYP71AZ3, xanthotoxol synthase : CYP71AZ4, Krieger, 2014 ; xanthotoxine monooxygénase : CYP71AZ6, Roselli *et al.*, manuscrit en préparation). Le gène *CYP71AZ6* de panais est un orthologue de *CYP71AZ1* chez *A. majus*, qui code un cytochrome P450 responsable de l'hydroxylation de la xanthotoxine en position 5 (Roselli *et al.*, manuscrit en préparation). Ces deux cytochromes P450 ont également la capacité d'hydroxyler l'herniarine en position 5 (Roselli *et al.*, manuscrit en préparation). En termes de fonction, ils sont donc très proches des CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava, ainsi que des CYP82C2 et CYP82C4 d'*A. thaliana*. Pourtant, ces enzymes ne font pas partie de la même famille et leurs structures primaires sont relativement éloignées (environ 28 % d'identité entre les CYP71 et les CYP82, tableau 30), même si l'on observe quelques homologies, comme par exemple au niveau du cinquième SRS (figure 66).

	CYP82C2 At	CYP82C4 At	CYP82D64 Cc	CYP82D64 Cp	CYP82D64 Ch	CYP71AZ1 Am	CYP71AZ6 Ps
CYP82C2 At	ID	88,4 %	51,5 %	50,6 %	50,4 %	28,8 %	28,8 %
CYP82C4 At	94,7 %	ID	52,8 %	51,7 %	51,5 %	28,7 %	28,8 %
CYP82D64 Cc	69,5 %	70,5 %	ID	96,4 %	96,4 %	28,9 %	28,6 %
CYP82D64 Cp	68,8 %	69,7 %	97,2 %	ID	97,6 %	28,6 %	28,3 %
CYP82D64 Ch	68,8 %	69,7 %	97,9 %	98,5 %	ID	28,6 %	28,3 %
CYP71AZ1 Am	49,4 %	48,9 %	46,5 %	45,8 %	45,8 %	ID	85,2 %
CYP71AZ6 Ps	47,9 %	48,0 %	46,8 %	46,0 %	46,1 %	91,3 %	ID

Tableau 30. Pourcentages d'identité et de similarité entre les séquences protéiques des CYP82 et CYP71.

Les pourcentages d'identité (en rose) et de similarité (en bleu) ont été déterminés en utilisant le logiciel BioEdit (matrice de similarité BLOSUM62). *A. thaliana* (At), *C. clementina* (Cc), *C. paradisi* (Cp), *C. hystrix* (Ch), *A. majus* (Am), *P. sativa* (Ps).

Ceci suggère donc une évolution convergente des *CYP71AZ* d'Apiacées et des *CYP82C* et *CYP82D* d'*A. thaliana* et de *Citrus* respectivement. Cependant, chez *A. thaliana*, l'activité d'hydroxylation de la xanthotoxine en position 5 par CYP82C2 et CYP82C4 semble opportuniste, puisque cette plante ne produit pas de furocoumarines. De plus, une nouvelle activité a été identifiée pour CYP82C2, qui intervient dans la synthèse de 4-hydroxyindole-3-carbonyle nitrile à partir d'indole-3-carbonyle nitrile (Rajniak *et al.*, 2015). Concernant l'évolution convergente des *CYP82* et *CYP71*, des espèces qui ne sont pas proches phylogénétiquement, peuvent en effet mettre en place des processus d'adaptation identiques, malgré des origines indépendantes, pour répondre aux stress environnementaux (Tanaka *et al.*, 2009). Dans notre cas, l'apparition des coumarines et furocoumarines chez les Apiacées et chez les Rutacées semble s'être produite de façon indépendante *via* les *CYP71* et *CYP82* respectivement, suggérant un rôle très important de ces métabolites dans l'adaptation de ces plantes à leur environnement. Il est probable que cette convergence évolutive concerne l'ensemble des gènes de la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les Apiacées et chez les Rutacées. En effet, des études réalisées au LAE (Larbat et Hehn, non publié), ont montré que des approches de PCR avec des amorces dégénérées de *CYP71* d'Apiacées, n'ont jamais permis de découvrir des séquences homologues chez les *Citrus*.

Ce phénomène d'évolution convergente a déjà été reporté dans la littérature. Des gènes codant pour des enzymes appartenant à différentes familles et intervenant dans le métabolisme spécialisé de plantes ou d'insectes peuvent avoir des fonctions identiques. C'est par exemple le cas des anthocyanine-5-*O*-glucosyltransférases de *Dianthus caryophyllus* et d'*A. thaliana* qui présentent des structures différentes mais qui ont la même fonction de glycosylation d'anthocyanes (Tohge *et al.*, 2013). De la même manière, chez les cytochromes P450, les férulate-5-hydroxylase d'angiosperme (CYP84A) et de *Selaginella moellendorfii* (CYP788A1) qui ne présentent que 37 % d'identité au niveau de leurs séquences protéiques, jouent le même rôle dans la synthèse d'unités S de lignine (Weng *et al.*, 2010). L'émergence indépendante de ces deux enzymes suggère que la synthèse d'unités syringyles de lignine confère un avantage sélectif aux plantes terrestres (Mizutani et Ohta, 2010). Il arrive même qu'une évolution convergente se produise dans des règnes différents, comme avec les CYP79 et CYP71 de plantes qui interviennent dans les mêmes étapes de la voie de biosynthèse des glycosides cyanogènes que les CYP405A2 et CYP332A5 respectivement chez la larve *Zygaena larva* (Jensen *et al.*, 2011).

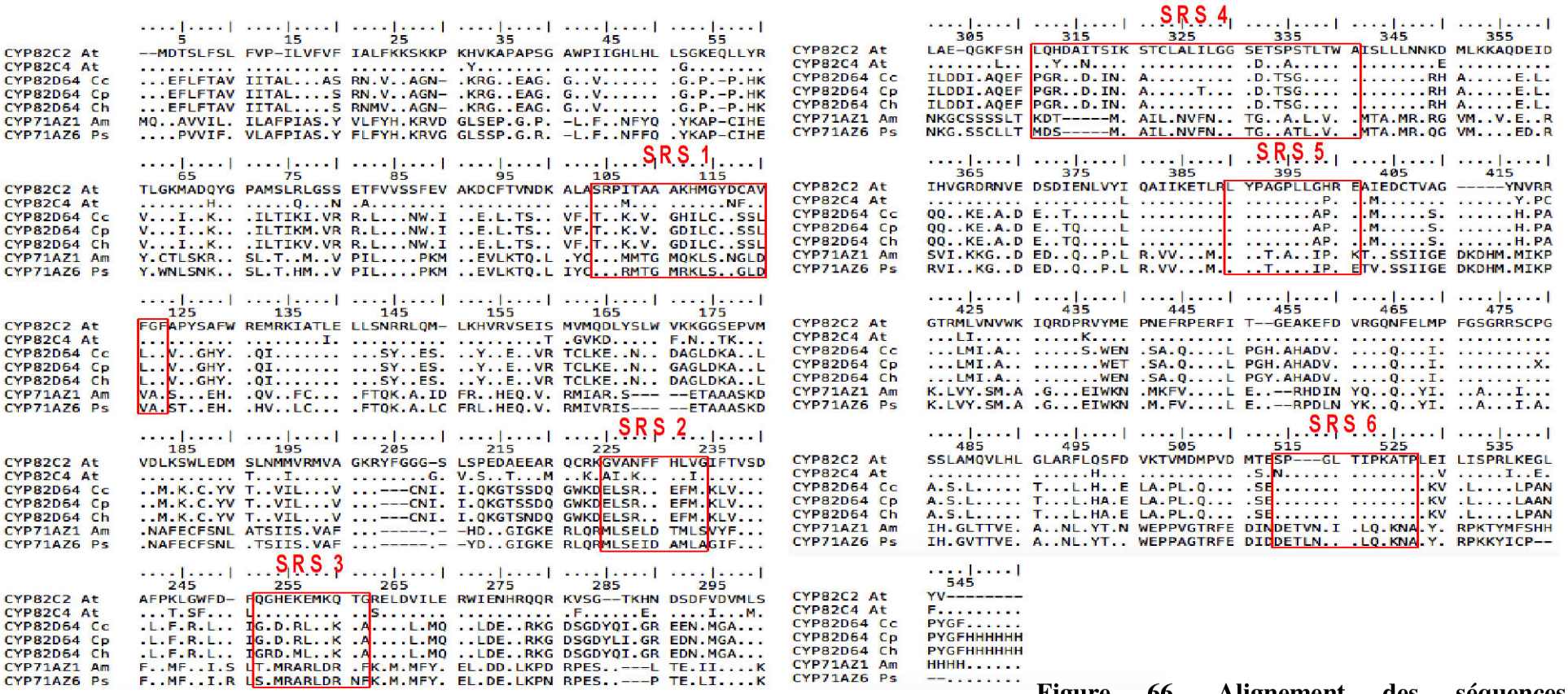


Figure 66. Alignement des séquences protéiques des *CYP82* et *CYP71* déduites des séquences nucléotidiques.

L'alignement a été réalisé en utilisant le logiciel BioEdit (alignement ClustalW). *A. thaliana* (At), *C. clementina* (Cc), *C. paradisi* (Cp), *C. hystrix* (Ch), *A. majus* (Am), *P. sativa* (Ps).

3.4.3 Évolution de la synthèse de coumarines et furocoumarines au cours de la maturation du pomelo Ruby

J'ai suivi le niveau d'expression de *CYP82D64* de pomelo Ruby et la composition en coumarines et furocoumarines dans différents tissus des fruits de cet agrume au cours de leur maturation. Pour chacun des tissus étudiés (flavédo, albédo, pulpe), j'ai observé une diminution significative du niveau d'expression de *CYP82D64* de pomelo Ruby (figure 54) ainsi qu'une diminution des concentrations totales en coumarines et furocoumarines (figure 55). Il est donc probable que comme pour *CYP82D64*, les autres gènes intervenant dans la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez le pomelo Ruby soient également de moins en moins exprimés au cours de la maturation des fruits. D'autres études ont reporté la diminution de la synthèse de composés de défense au cours de la maturation des fruits. C'est par exemple le cas chez le raisin pour lequel la production de resvératrol (famille des stilbènes) diminue depuis le stade de fruit vert jusqu'à la maturité complète des baies, pour atteindre une valeur quasiment nulle dans le fruit mûr (Hellín *et al.*, 2010). De même, chez les solanacées, on observe une diminution de la teneur en alcaloïdes au cours de la maturation du fruit (diminution des quantités de capsaicinoïdes chez le piment de Cayenne, Barbero *et al.*, 2014 et des glycoalcaloïdes chez la tomate, Friedman, 2002). La diminution de la production de composés de défense comme les coumarines et furocoumarines au cours de la maturation du fruit, peut certainement s'expliquer par la nécessité de la plante de disperser les graines à maturité. Le but est ainsi d'assurer la reproduction de la plante. En revanche, lorsque les graines sont encore immatures, le fruit doit pouvoir se protéger contre les attaques d'herbivores, il produit alors de grandes quantités de composés de défense.

Concernant les résultats de quantification de *CYP82D64* et des coumarines et furocoumarines de pomelo Ruby, je n'ai pas pu faire de lien entre les quantités relatives de *CYP82D64* et les teneurs en xanthotoxine et 5-hydroxy-xanthotoxine dans le flavédo et l'albédo des fruits au cours de leur maturation. En effet, ces deux furocoumarines ne sont pas présentes dans ces tissus (figures 56 et 57 respectivement). Mais étant donné que j'ai tout de même pu quantifier *CYP82D64* dans le flavédo et l'albédo, il y a de grandes chances que l'enzyme soit tout de même présente dans ces tissus. Le flavédo et l'albédo de pomelo contiennent majoritairement des coumarines et furocoumarines prénylées et géranylées (principalement du groupe du bergaptène) (figure 55-A et B). En prenant en compte cette répartition, j'émets l'hypothèse que la 5-hydroxy-xanthotoxine doit rapidement être convertie en d'autres furocoumarines présentant des structures plus complexes. Il peut par exemple s'agir de méthylations (isopimpinelline) ou de prénylations (cnidiline) (cf. figure 1 de la publication n°2). D'ailleurs, j'ai pu identifier de l'isopimpinelline dans le flavédo de pomelos aux stades intermédiaire et mûr (annexe 11). La peau du fruit est le tissu le plus exposé aux agressions par des pathogènes. Elle doit donc produire des substances bioactives efficaces pour pouvoir se défendre contre ces agressions. Une étude a montré que les furocoumarines présentant un groupement prényl sont plus liposolubles que les autres, ce qui facilite leur passage au travers des membranes bactériennes et les rend donc plus efficaces (Stavri et Gibbons, 2005). Ceci peut expliquer pourquoi nous identifions très peu de formes

« basiques » de coumarines et furocoumarines dans la peau de pomelo Ruby et au contraire de nombreuses formes prénylées et géranylées.

La pulpe de pomelo contient également ces formes prénylées et géranylées, mais elle renferme en plus de grandes quantités de furocoumarines simples telles que le psoralène ou le bergaptol (figure 55-C). Cette fois, j'ai même pu y identifier de la xanthotoxine et de la 5-hydroxy-xanthotoxine (figures 56 et 57 respectivement). La pulpe du fruit étant protégée par la peau (flavédo + albédo), elle est moins exposée aux attaques par des pathogènes. Or la théorie de la défense optimale (McKey, 1974) prend en compte trois facteurs : la probabilité d'une attaque, la valeur de la partie de la plante menacée et le coût de la défense. Les tissus les moins menacés par une attaque d'herbivore doivent avoir une défense constitutive basse, mais hautement inductible dans le cas d'une attaque. Au contraire, les tissus étant régulièrement soumis aux agressions doivent avoir de fortes défenses constitutives, mais faiblement inductibles (Zangerl et Rutledge, 1996). Dans notre cas, nous pouvons donc imaginer que la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines dans la pulpe soit parfois interrompue au niveau des formes basiques de ces métabolites afin de limiter les coûts énergétiques qu'impliquent les prénylations et géranylations. Au contraire, au niveau du flavédo et de l'albédo du fruit qui sont des tissus régulièrement attaqués et jouant un rôle protecteur pour les graines présentes au niveau de la pulpe, les coumarines et furocoumarines prénylées et géranylées assurent une défense efficace du fruit contre les attaques d'herbivores.

La pulpe de pomelo Ruby contenant plus de furocoumarines à structure basique, j'ai pu faire un lien entre le niveau d'expression de *CYP82D64* et les teneurs en 5-hydroxy-xanthotoxine. En effet, dans ce tissu, les quantités relatives de *CYP82D64* sont divisées par 2,3 entre le stade « jeune fruit » et le stade intermédiaire, tandis que les teneurs en 5-hydroxy-xanthotoxine sont divisées par 1,8 entre ces mêmes stades (figures 54 et 57 respectivement). Ceci montre qu'il existe une bonne corrélation entre le niveau d'expression de *CYP82D64* et les teneurs en 5-hydroxy-xanthotoxine formée lors de la métabolisation de la xanthotoxine par CYP82D64. Une telle corrélation n'a par contre pas pu être démontrée entre les stades « intermédiaire » et « fruit mûr » car la 5-hydroxy-xanthotoxine n'est plus que détectable dans le fruit mûr (annexe 11).

Pour aller plus loin dans la caractérisation fonctionnelle de *CYP82D64*, il serait maintenant intéressant d'effectuer son expression transitoire dans des feuilles de tabac (*Nicotiana benthamiana*), afin de réaliser des tests d'activité *in planta*. Cette méthode a déjà été utilisée pour la caractérisation *in planta* de *CYP76C3* et *CYP71B31*, qui sont impliqués dans le métabolisme du linalool chez *A. thaliana* (Ginglinger *et al.*, 2013). De même, au sein de notre laboratoire, il a été montré que CYP98A22 est impliqué dans l'hydroxylation du *p*-coumaroyl quinate et du *p*-coumaroyl shikimate en position 3', *in planta* (Karamat *et al.*, 2012).

3.4.4 *CYP71CE1* d'orange douce et de pomelo : un pseudogène

Un autre gène candidat identifié par Victoire Coqueret lors de son stage de Master est le gène de *Citrus CYP71CE1*. J'ai pu montrer que chez l'orange douce et chez le pomelo Ruby, ce gène est vraisemblablement un pseudogène. En effet, le premier intron n'est pas

excisé, ce qui entraîne un changement du cadre de lecture de l'ARNm produit et conduit à la formation d'une protéine raccourcie et donc non fonctionnelle (figure 62). Pourtant, l'intron en question possède bien les signaux canoniques d'épissage GT-AG. Dans la littérature, d'autres cas de rétention d'introns dans les séquences codantes de gènes ont déjà été reportés. La séquence du gène codant pour la protéine phosphatase 1c γ chez la souris conserve le dernier intron, ce qui conduit à l'apparition d'un codon stop peu après le signal d'épissage ignoré et aboutit à une protéine raccourcie non fonctionnelle (Okano *et al.*, 1997). De même, chez *A. thaliana*, 64 % des cas d'épissage alternatif sont des rétentions d'intron, qui pourtant présentent bien les bordures canoniques GT-AG (Ner-Gaon *et al.*, 2004).

Les pseudogènes issus de la rétention d'introns peuvent ne pas être exprimés, comme c'est le cas pour le pseudogène codant normalement la méthylènetétrahydrofolate réductase chez la souris et dont le second intron est partiellement épissé (Leclerc *et al.*, 2003). Mais ces pseudogènes peuvent également conduire à la formation d'ARN messagers qui sont stockés dans le noyau, en attendant d'être épissés ou transportés dans le cytosol (Ner-Gaon *et al.*, 2004). C'est a priori le cas du *CYP71CE1*, dont le niveau d'expression était plus important chez le pomelo que chez l'orange douce (Coqueret, 2013).

En plus des rétentions d'intron, les mutations ponctuelles et/ou les insertions-délétions (indels) peuvent également conduire à la pseudogénisation (Bensasson *et al.*, 2001). Les pseudogènes anciens accumulent une telle quantité de mutations au cours du temps, qu'il devient parfois très difficile d'établir des homologies avec le gène d'origine codant pour une protéine fonctionnelle (Podlaha et Zhang, 2001). Les séquences nucléotidiques codantes de *CYP71CE1* que j'ai obtenues lors du clonage de ce gène chez l'orange douce et chez le pomelo Ruby, permettent de retrouver le gène originel *orange1.1g048790*, par un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sur la base de données de Phytozome. Je peux donc émettre l'hypothèse que ce pseudogène n'est pas très ancien. Il faut tout de même noter que la séquence codante de *CYP71CE1* chez le pomelo présente une différence de plus que celle de l'orange douce par rapport à la séquence d'origine : une délétion de 18 nucléotides aboutissant une fois de plus à une protéine raccourcie. Le pomelo étant issu de l'hybridation d'un oranger doux et d'un pamplemoussier et l'oranger doux dérivant lui-même de croisements entre mandariniers et pamplemoussiers (Curk *et al.*, 2015), il serait intéressant d'étudier les séquences codantes de *CYP71CE1* chez le mandarinier et chez le pamplemoussier. Nous pourrions ainsi savoir si *CYP71CE1* est également un pseudogène chez ces espèces, ou s'il conduit encore à la formation d'une protéine fonctionnelle.

3.5 Conclusion

Pour attribuer une fonction aux quatre gènes candidats retenus par Victoire Coqueret lors de son stage de Master, mon travail consistait à les cloner et à les surexprimer dans la levure, afin de pouvoir réaliser un criblage métabolique avec les protéines obtenues. Pour le gène *CYP82D64*, j'ai pu cloner les séquences codantes provenant du pomelo Ruby et du Combava. Elles codent la xanthotoxine-5-monooxygénase qui convertit la xanthotoxine en 5-hydroxy-xanthotoxine *in vitro*. *CYP82D64* de Combava hydroxyle également l'herniarine en position 5 pour donner la 5-hydroxy-7-méthoxycoumarine, même si cette activité paraît

opportuniste. Les différences d'affinité entre CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava et leurs substrats ainsi que les différences d'activité observées peuvent être expliquées par l'analyse des structures tridimensionnelles de ces protéines. Par ailleurs, j'ai mis en évidence une corrélation entre le niveau d'expression de *CYP82D64* de pomelo Ruby et la production de coumarines et furocoumarines (en particulier de 5-hydroxy-xanthotoxine) qui diminuent dans le flavédo, l'albédo et la pulpe des fruits au cours de leur maturation. La diminution de la synthèse de ces composés de défense au cours du développement du fruit semble indiquer la nécessité pour la plante de disperser ses graines lorsqu'elles sont arrivées à maturité.

Les gènes *CYP82D64* de pomelo Ruby et de Combava présentent la même fonction que les gènes *CYP82C2* et *CYP82C4* d'*A. thaliana* et que les gènes *CYP71AZ1* d'*A. majus* et *CYP71AZ6* de *P. sativa*. Étant donné qu'ils ne font pas partie de la même famille de cytochromes P450, il s'agit d'une évolution convergente des *CYP82* et *CYP71*, montrant l'importance de l'apparition des furocoumarines pour la défense des plantes contre les ravageurs, dans deux groupes taxonomiques différents.

Au cours de ce travail, j'ai également cloné le gène *CYP71CE1* chez l'orange douce et le pomelo Ruby. Ce gène est vraisemblablement un pseudogène du fait de la rétention du premier intron lors de la transcription de sa séquence génomique. Cette rétention est à l'origine de l'apparition d'un codon stop prématurément et aboutit à une protéine raccourcie et non fonctionnelle. Je n'ai donc pas pu déterminer la fonction originelle de ce gène.

Mes tentatives de clonage du gène *CYP71AN25* sont restées vaines. Il semble que ce gène soit très peu exprimé chez les agrumes, dans les conditions que j'ai testées (ex : maturité, variétés). En revanche, j'ai réussi à cloner le gène *CYP82C46* chez la bigarade. Le problème est que je n'ai jamais réussi à obtenir la protéine correspondante chez la levure. Je n'ai donc pas pu identifier sa fonction.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de mon travail de thèse était d'identifier et de caractériser fonctionnellement des gènes codant pour des cytochromes P450 impliqués dans la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes. Le contexte initial de mon travail était que nous en savions peu sur la production de ces métabolites chez les agrumes et que nous ne connaissions aucun cytochrome P450 impliqué dans leur production chez les *Citrus*. En revanche, plusieurs gènes de la famille des *CYP71* avaient déjà été caractérisés d'un point de vue fonctionnel chez les Apiacées (Larbat *et al.*, 2007 ; Larbat *et al.*, 2009 ; Krieger, 2014) et deux gènes de la famille des *CYP82C* étaient connus pour métaboliser la xanthotoxine, a priori de façon opportuniste, chez *A. thaliana* (Kruse *et al.*, 2008). Nous avions également à disposition des banques d'ADN génomique de clémentine et d'orange douce sur la base de données Phytozome. Dans ce contexte, mon travail s'est organisé de la manière suivante : créer une méthode d'analyse de coumarines et furocoumarines en UPLC-MS dans des tissus de fruits d'agrumes ; réaliser un état des lieux de la production de ces composés chez diverses espèces d'agrumes ; puis identifier et caractériser fonctionnellement des gènes impliqués dans leur voie de biosynthèse chez ces plantes, en utilisant les résultats obtenus lors des deux étapes précédentes.

Création, optimisation et validation d'une méthode d'analyse en UPLC-MS de 28 coumarines et furocoumarines dans des échantillons de peau et de pulpe d'agrumes

Nous avons donc mis en place une stratégie d'équipe qui consistait en premier lieu à créer une méthode d'analyse de coumarines et furocoumarines dans la peau et la pulpe d'agrumes par UPLC-MS. Le but étant par la suite d'utiliser cette méthode pour réaliser le chémotypage d'un large panel de variétés d'agrumes, elle se devait d'être rapide, fiable et sensible (les métabolites secondaires sont en faibles concentrations dans les tissus végétaux). Nous sommes parvenus à ces objectifs en créant une méthode permettant la séparation et la détection optimales de 28 composés (6 coumarines et 22 furocoumarines) dans des extraits de peau et de pulpe d'agrumes, en 20 minutes seulement et cela de façon fiable, grâce à une bonne résolution et une bonne sélectivité. Par ailleurs, nous avons bien validé la méthode selon les normes requises (linéarité, limites de détection et de quantification, spécificité, précision, justesse et robustesse). Ce travail a été valorisé par une première publication pour laquelle je suis première auteure (Dugrand *et al.*, 2013). Sur la base de cette première méthode analytique, une nouvelle méthode d'UPLC-MS permettant en plus l'analyse de flavonoïdes chez les agrumes a été créée dans le cadre de la thèse de Marie Durand (INRA de San Giuliano, Corse), faisant partie de l'équipe de Yann Froelicher (Durand-Hulak *et al.*, 2015). Cette méthode a fait l'objet d'une deuxième publication à laquelle j'ai été associée (annexe 6). Par ailleurs, notre méthode initiale permettait aussi de doser la 8-géranylumbelliférone, composé que nous ne pouvions plus doser à partir du moment où nous avons manqué de standard (non commercialisé). Les résultats de dosage de ce composé chez 56 variétés d'agrumes ont été intégrés dans une publication de Ryousuke Munakata de

l'université de Kyoto au Japon (Munakata *et al.*, 2014), à laquelle j'ai également été associée (annexe 7).

Chémotypage de 62 variétés d'agrumes du genre *Citrus* pour l'identification d'espèces faiblement et fortement productrices de coumarines et furocoumarines

Suite à ce premier travail, nous avons utilisé cette méthode d'UPLC-MS sur un large panel de variétés de *Citrus* afin d'identifier des fruits faiblement et fortement producteurs de coumarines et furocoumarines. Ainsi, nous avons pu distinguer les papedas, les pamplemousses, les oranges amères, les pomelos, les cédrats, la bergamote et certaines limes, qui sont de forts producteurs de coumarines et furocoumarines, des mandarines et des oranges douces, qui sont de faibles producteurs. Outre ces résultats, nous avons aussi analysé la structuration de la diversité génétique des agrumes du genre *Citrus* en fonction des coumarines et furocoumarines qu'ils produisent. Nous avons ainsi pu identifier quatre groupes de variétés correspondant aux quatre taxons ancestraux (pamplemoussier, mandarinier, papedas, cédratiers) et à leurs hybrides les plus proches. Ces quatre groupes se caractérisent par une production différentielle de coumarines et furocoumarines se distinguant par des groupements hydroxyles, méthoxyles, prényls ou géranyls. Nous avons également mis en évidence des phénomènes de dominance, de co-dominance et de transgression en ce qui concerne l'héritabilité de la production de ces composés. Ces résultats nous ont amené à formuler l'hypothèse selon laquelle des rétrocroisements impliquant des mandariniers dans des schémas de sélection variétale, permettraient d'abaisser le taux de coumarines et furocoumarines dans les agrumes. Les résultats de chémotypage du tangelo Minneola sont cohérents avec cette hypothèse puisque les contributions génétiques de mandarinier et de pamplemoussier y sont de 70 % et 30 % respectivement (Curk, 2014) et les teneurs en coumarines et furocoumarines y sont quasiment nulles, comme chez le mandarinier. Ce travail conséquent a donné lieu à une quatrième publication qui est actuellement en cours d'évaluation, après correction, pour le journal PLoS One et pour laquelle je suis première auteure.

Identification et caractérisation fonctionnelle de cytochromes P450 potentiellement impliqués dans la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes

En parallèle de mon doctorat, la stratégie d'équipe mise en place consistait à effectuer une courte liste de gènes candidats à la synthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes. C'est Victoire Coqueret qui s'est penchée sur ce travail lors de son stage de Master au sein de notre laboratoire et en collaboration avec l'équipe de Yann Froelicher de l'unité AGAP de la station de recherche INRA/CIRAD de Corse. Pour cela, elle a dressé une liste de sept gènes codant pour des cytochromes P450 chez la clémentine et chez l'orange douce et présentant des homologies de séquences avec les *CYP71* et *CYP82* déjà caractérisés chez les Apiacées et chez *A. thaliana* (outil BLAST sur a base de données Phytozome). Elle a ensuite effectué des qPCR pour déterminer le niveau d'expression de ces sept gènes chez l'orange douce (variété faiblement productrice de coumarines et furocoumarines) et chez le pomelo et

la bergamote (variétés fortement productrices). Parmi ces sept gènes, quatre (*Ciclev10018132* ou *CYP71AN25*, *Ciclev10025349* ou *CYP82D64*, *Ciclev10028201* ou *CYP82C46* et *orange1.1g048790* ou *CYP71CE1*) étaient plus fortement exprimés chez le pomelo et la bergamote que chez l'orange douce (Coqueret, 2013).

À partir de ce travail préliminaire, la dernière étape de mon travail consistait à étudier ces gènes candidats chez diverses variétés d'agrumes et à vérifier s'ils étaient ou non impliqués dans la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines. J'ai pu identifier des variants alléliques du gène *CYP82D64* de clémentine chez le pomelo Ruby et chez le Combava. Ce gène code un cytochrome P450 qui métabolise la xanthotoxine en 5-hydroxy-xanthotoxine chez le pomelo Ruby et chez le Combava. Les constantes d'affinité K_m obtenues *in vitro* montrent que la xanthotoxine est probablement un substrat naturel de ces deux enzymes. En revanche, CYP82D64 de Combava métabolise également l'herniarine en 5-hydroxy-7-méthoxycoumarine, mais de façon opportuniste a priori. Les différences d'activité observées entre CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava, ainsi que les différences d'affinité déterminées avec les substrats sont cohérentes avec les modélisations des structures tridimensionnelles de ces enzymes. Par ailleurs, j'ai pu mettre en évidence une corrélation positive (diminution) entre le niveau d'expression de *CYP82D64* et la teneur en coumarines et furocoumarines et notamment en 5-hydroxy-xanthotoxine dans des fruits de pomelo Ruby au cours de leur maturation. Selon moi, la diminution de la production de ces composés de défense joue un rôle dans la dispersion des graines lors de leur maturité.

L'activité de xanthotoxine-5-monooxygénase identifiée chez les cytochromes P450 CYP82D64 de pomelo Ruby et de Combava est la même que celle de CYP71AZ1 d'*A. majus* et de CYP71AZ6 de *P. sativa* identifiées par le Dr. Sandro Roselli au sein du LAE. Pourtant, ces protéines ne font pas partie de la même famille de cytochromes P450. Nous avons donc mis en évidence l'existence d'une évolution convergente entre les *CYP82* des Rutacées et les *CYP71* des Apiacées. Cette évolution convergente dénote l'importance de l'apparition des coumarines et furocoumarines chez ces plantes, dans la défense contre les insectes herbivores et les pathogènes. De telles conclusions ont déjà été formulées avec par exemple l'évolution convergente des férulate-5-hydroxylases d'angiosperme (CYP84A) et de *S. moellendorfii* (CYP788A1), qui suggère également l'importance de la synthèse d'unités syringyles de lignine pour les plantes terrestres (Mizutani et Ohta, 2010 ; Weng *et al.*, 2010).

J'ai également étudié le gène candidat *CYP71CE1*. J'ai montré que chez l'orange douce et chez le pomelo Ruby, les ARN messagers produits à partir de ce gène conservent le premier intron, ce qui est à l'origine de l'apparition d'un codon stop de façon prématurée dans la séquence et conduit à une protéine raccourcie et non fonctionnelle. Je n'ai donc pas pu déterminer la fonction initiale de *CYP71CE1*, qui est maintenant vraisemblablement un pseudogène chez l'orange douce et le pomelo Ruby.

Concernant les deux autres gènes candidats identifiés par Victoire Coqueret (*CYP82C46* et *CYP71AN25*), je n'ai pas pu non plus déterminer leur fonction. Pour le premier, je n'ai en effet jamais pu surexprimer la protéine correspondante dans la levure. Pour le second, je n'ai jamais réussi à l'amplifier par PCR.

Cette dernière partie (et notamment la caractérisation fonctionnelle de *CYP82D64* chez le pomelo Ruby et chez le Combava) fera également l'objet d'une publication, qui est actuellement en cours de préparation.

Perspectives

De façon générale, les différentes étapes de la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les Apiacées font principalement intervenir des enzymes de la famille CYP71. Ayant montré l'existence d'une évolution convergente entre les enzymes CYP82 et CYP71 de Rutacées et d'Apiacées respectivement, j'émets l'hypothèse que les autres étapes de la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes font également intervenir des enzymes de la famille CYP82. Aussi, à court terme, je pense que le premier travail sur lequel il faudrait se pencher est la caractérisation fonctionnelle du gène *CYP82C46* de bigarade. La séquence protéique déduite de la séquence nucléotidique de ce gène présente environ 51 % d'identité et plus de 67 % de similarités avec celles des CYP82D64 de clémentine, de pomelo Ruby et de Combava (annexe 14). Il est donc possible que cette enzyme intervienne également dans la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes. Actuellement, le gène est correctement inséré dans le vecteur PYeDP60_GW®, mais il semble que la transformation de levures effectuée n'ait pas fonctionné sur les deux colonies testées. En effet, la protéine CYP82C46 était absente sur le Western Blot. Par manque de temps, je n'ai pas refait la transformation de levures suivie d'un Western Blot et d'un criblage métabolique, dans le cas où la protéine serait détectée. C'est donc cette étape qu'il faudrait reprendre.

La recherche de ces différents gènes candidats à la synthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes, a été initiée au cours de mon doctorat, lorsque nous en savions plus sur la production de ces composés chez les *Citrus*. Nous avions alors distingué les variétés d'agrumes faiblement et fortement productrices de coumarines et furocoumarines et les quatre groupes de variétés d'agrumes formés selon les types de composés produits (hydroxylés, méthoxylés, prénylés ou géranylés). L'hypothèse que nous avions faite à ce moment, était que les *Citrus* étant très proches d'un point de vue phylogénétique, ils devaient tous posséder les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines. En revanche, ces gènes devaient être soumis à une régulation de leur expression, *via* des facteurs de transcription propres à chaque espèce. C'est ainsi que lors de son stage de Master, Victoire Coqueret a pu montrer une expression différentielle de certains gènes candidats, chez des variétés d'agrumes faiblement et fortement productrices de coumarines et furocoumarines (Coqueret, 2013). Ces gènes avaient préalablement été sélectionnés pour leur homologie de séquence avec les gènes déjà caractérisés chez les Apiacées et chez *A. thaliana*. Notre recherche était donc basée sur une approche ciblée, du fait que nous n'avions aucune information sur les cytochromes P450 intervenant dans la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes. Aujourd'hui en revanche, nous connaissons les types et quantités de coumarines et furocoumarines produites chez un grand nombre de variétés d'agrumes et nous savons que deux cytochromes P450 de la famille des CYP82 interviennent dans leur production chez le pomelo Ruby et chez le Combava. Ces connaissances pourront être particulièrement utiles à l'avenir, dans le cadre de la recherche de

nouveaux gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes. En effet, la construction de banques transcriptomiques de variétés d'agrumes présentant des profils métaboliques différents, pourrait mettre en évidence des profils d'expression différentiels de cytochromes P450. Par exemple, pour effectuer une recherche de gènes impliqués dans la synthèse de furocoumarines du groupe du bergaptène, nous pourrions comparer des banques transcriptomiques de pamplemoussier (fort producteur de furocoumarines du groupe du bergaptène) et d'oranger doux (très faible producteur de furocoumarines). La recherche de gènes impliqués dans la synthèse de furocoumarines du groupe de la xanthotoxine ou de l'isopimpinelline devrait plutôt s'effectuer en comparant des banques transcriptomiques de pomelo (produisant majoritairement des furocoumarines du groupe du bergaptène) et de papeda (produisant tous types de furocoumarines) par exemple. Cette recherche devrait se focaliser dans un premier temps, sur des gènes codant pour des cytochromes P450 de la famille CYP82.

L'identification de nouveaux gènes codant pour des cytochromes P450 intervenant dans la synthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes, fournira de nouvelles pistes pour l'amélioration génétique de ces plantes, dans le but d'obtenir des fruits ne produisant que très peu de ces composés, voire pas du tout. En effet, il sera alors possible de faire un état des lieux de l'expression de ces gènes dans différentes variétés d'agrumes, comme nous l'avions fait avec la quantification des coumarines et furocoumarines chez différentes espèces et de mettre alors en relation ou non les résultats obtenus. Dans ce cadre, il serait intéressant de vérifier si notre hypothèse d'impliquer les mandariniers dans les programmes de sélection variétale visant à abaisser les taux de furocoumarines dans les fruits est toujours valable.

Une autre technique pourrait également permettre de sélectionner des variétés d'agrumes ne produisant que très peu voire pas de coumarines et furocoumarines du tout. Il s'agit de l'édition de gènes par l'utilisation du système CRISPR/Cas 9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR Associated protein 9). La protéine Cas 9 est une endonucléase qui coupe l'ADN double brin et induit indirectement la mutation d'un gène ciblé lors de sa réparation. Cette mutation peut être à l'origine de l'inactivation du gène en question. Le système CRISPR/Cas 9 est réputé comme étant efficace et il a déjà été utilisé pour éteindre des gènes chez les plantes (Mikami *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2015). Lorsque nous connaîtrons d'autres cytochromes P450 impliqués dans la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes, il est envisageable d'utiliser le système CRISPR/Cas 9 pour éteindre les gènes les codant. Ainsi, nous serions capables de couper certaines parties de cette voie, comme par exemple la synthèse des composés du groupe du bergaptène, en supprimant le gène codant pour la psoralène-5-monooxygénase ou encore la synthèse des composés du groupe de la xanthotoxine, en supprimant le gène codant pour la psoralène-8-monooxygénase (cf. figure 1 de la publication n°2). La suppression de toutes les furocoumarines pourrait éventuellement passer par l'inactivation du gène codant pour la première enzyme de la voie qui est une prényltransférase qui intervient sur l'umbelliférone (cf. figure 1 de la publication n°2).

L'extinction de la voie des coumarines et des furocoumarines chez les agrumes pourrait avoir un large impact économique, que ce soit pour les industries agro-alimentaires ou pour celles de la cosmétique. En effet, la production de jus de pomelos sans

furocoumarines pourrait permettre de relancer leur consommation, qui a chuté dans les pays développés depuis la découverte de l'effet pomelo. Pour les industries de la cosmétique qui subissent les normes de doses maximales de furocoumarines dans leurs produits, la création de variétés d'agrumes ne contenant plus ces composés, pourrait faciliter la fabrication des cosmétiques, d'un point de vue technique et financier. En effet, il ne serait plus nécessaire d'éliminer les furocoumarines présentes dans les huiles essentielles par exemple, ce qui représente une étape de production en moins et donc des économies.

Dans le cadre de l'élimination de la voie de biosynthèse des coumarines et des furocoumarines chez les agrumes, il faudra tout de même se pencher sur l'impact d'une telle modification sur la plante et en particulier lors d'attaques par des herbivores ou des ravageurs. Aujourd'hui, les producteurs d'agrumes sont soumis à une menace majeure, qui est la maladie du dragon jaune (ou huanglongbing), provoquée par les bactéries *Candidatus liberibacter asiaticum* et *C. liberibacter africanum*. Les orangers et mandariniers y sont particulièrement sensibles. Or ce sont également des variétés d'agrumes ne produisant que très peu de coumarines et furocoumarines, selon les analyses biochimiques que j'ai effectuées lors de mon doctorat. Aucune corrélation entre la sensibilité à la maladie du dragon jaune et l'absence de production de coumarines et furocoumarines chez les agrumes, n'a encore été mise en évidence à ce jour. J'estime qu'il serait donc intéressant d'étudier les liens entre le production de ces composés et la sensibilité aux ravageurs, tout en sachant que les agrumes produisent d'autres composés de défense, tels que les flavones polyméthoxylées (Ortuno *et al.*, 2002 ; Del Rio *et al.*, 1998) et que leur culture implique des traitements préventifs contre les ravageurs.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abramowitz, A.I., Resnik, K.S. and Cohen, K.R. (1993) Margarita photodermatitis. *N. Engl. J. Med.*, **328**, 891.

Acqua, F. Dall' and Martelli, P. (1991) Photosensitizing action of furocoumarins on membrane components and consequent intracellular events. *J. Photochem. Photobiol. B*, **8**, 235–254.

Adfa, M., Yoshimura, T., Komura, K. and Koketsu, M. (2010) Antitermite activities of coumarin derivatives and scopoletin from Protium javanicum Burm. f. *J. Chem. Ecol.*, **36**, 720–6.

Adrian, M. and Jeandet, P. (2012) Effects of resveratrol on the ultrastructure of Botrytis cinerea conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. *Fitoterapia*, **83**, 1345–1350.

Anaya, A.L., Macías-Rubalcava, M., Cruz-Ortega, R., García-Santana, C., Sánchez-Monterrubio, P.N., Hernández-Bautista, B.E. and Mata, R. (2005) Allelochemicals from Stauranthus perforatus, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Phytochemistry*, **66**, 487–494.

Andersen, B., Dongo, A. and Pryor, B.M. (2008) Secondary metabolite profiling of Alternaria dauci, A. porri, A. solani, and A. tomatophila. *Mycol. Res.*, **112**, 241–250.

Anthony, F.A., Laboda, H.M. and Costlow, M.E. (1997) Psoralen-fatty acid adducts activate melanocyte protein kinase C: a proposed mechanism for melanogenesis induced by 8-methoxypsoralen and ultraviolet A light. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **13**, 9–16.

Asthana, A., McCloud, E.S., Berenbaum, M.R. and Tuveson, R.W. (1993) Phototoxicity of Citrus jambhiri to fungi under enhanced UV-B radiation: Role of furanocoumarins. *J. Chem. Ecol.*, **19**, 2813–30.

Bailey, D.G., Dresser, G. and Arnold, J.M. (2013) Grapefruit-medication interactions: forbidden fruit or avoidable consequences? *Can. Med. Assoc. J.*, **185**, 309–16.

Bailey, D.G., Malcolm, J., Arnold, O. and Spence, J.D. (1998) Grapefruit juice-drug interactions. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **46**, 101–110.

Bailey, D.G., Spence, J.D., Edgar, B., Bayliff, C.D. and Arnold, J.M. (1989) Ethanol enhances the hemodynamic effects of felodipine. *Clin. Investig. Med. Médecine Clin. Exp.*, **12**, 357–362.

Balakirev, E.S. and Ayala, F.J. (2003) Pseudogenes: are they "junk" or functional DNA? *Annu. Rev. Genet.*, **37**, 123–151.

Ballester, A.-R., Lafuente, M.T., Vos, R.C.H. de, Bovy, A.G. and González-Candelas, L. (2013) Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part I: metabolic profiling in elicited fruits. *Food Chem.*, **136**, 178–185.

Barbero, G.F., Ruiz, A.G., Liazid, A., Palma, M., Vera, J.C. and Barroso, C.G. (2014) Evolution of total and individual capsaicinoids in peppers during ripening of the Cayenne pepper plant (Capsicum annuum L.). *Food Chem.*, **153**, 200–206.

Barilli, E., Rubiales, D., Amalfitano, C., Evidente, A. and Prats, E. (2015) BTH and BABA induce resistance in pea against rust (Uromyces pisi) involving differential phytoalexin accumulation. *Planta*, **242**, 1095–1106.

Barkley, N.A., Roose, M.L., Krueger, R.R. and Federici, C.T. (2006) Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theor. Appl. Genet.*, **112**, 1519–1531.

Barrett, H.C. and Rhodes, A.M. (1976) A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. *Syst. Bot.*, **1**, 105–136.

Beier, R.C. and Oertli, E.H. (1983) Psoralen and other linear furocoumarins as phytoalexins in celery. *Phytochemistry*, **22**, 2595–2597.
Bensasson, D., Petrov, D.A., Zhang, D.X., Hartl, D.L. and Hewitt, G.M. (2001) Genomic gigantism: DNA loss is slow in mountain grasshoppers. *Mol. Biol. Evol.*, **18**, 246–253.
Ben-Yehoshua, S., Rodov, V., Nafussi, B., Feng, X., Yen, J., Koltai, T. and Nelkenbaum, U. (2008) Involvement of limonene hydroperoxides formed after oil gland injury in the induction of defense response against Penicillium ditgitatum, in lemon fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 1889–1895.
Berenbaum, M.R., Nitao, J.K. and Zangerl, A.R. (1991) Adaptive significance of furanocoumarin diversity in Pastinaca sativa (Apiaceae). *J. Chem. Ecol.*, **17**, 207–215.
Berenbaum, M.R. and Zangerl, A.R. (1998) Chemical phenotype matching between a plant and its insect herbivore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 13743–13748.
Berenbaum, M.R. and Zangerl, A.R. (1993) Furanocoumarin metabolism in Papilio polyxenes: biochemistry, genetic variability, and ecological significance. *Oecologia*, **95**, 370–375.
Bernhardt, R. (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.*, **124**, 128–145.
Bourgaud, F., Allard, N., Guckert, A. and Forlot, P. (1989) Natural sources for furanocoumarins. In T. Fitzpatrick, P. Forlot, M. Pathak, and F. Urbach, eds. *Psoralens: past, present and future of photochemoprotection and other biological activities*. Paris: John Libbey Eurotext, pp. 301–306.
Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S. and Matern, U. (2006) Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochem. Rev.*, **5**, 293–308.
Brickl, R., Schmid, J. and Koss, F.W. (1984) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of psoralens after oral administration: considerations and conclusions. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **66**, 63–7.
Brown, S.A. (1963) Biosynthesis of the coumarins IV. The formation of coumarin and herniarin in lavender. *Phytochemistry*, **2**, 137–144.
Brown, S.A. and Sampathkumar, S. (1977) The biosynthesis of isopimpinellin. *Can. J. Biochem.*, **55**, 686–692.
Caffieri, S., Ruzzene, M., Guerra, B., Frank, S., Vedaldi, D. and Acqua, F. Dall' (1994) Psoralen-fatty acid cycloadducts activate protein kinase C (PKC) in human platelets. *J. Photochem. Photobiol. B*, **22**, 253–256.
Calka, O., Akdeniz, N., Metin, A. and Behçet, L. (2005) Phototoxic dermatitis due to Chenopodium album in a mother and son. *Contact Dermatitis*, **53**, 58–60.
Cancalon, P.F., Barros, S.M., Haun, C. and Widmer, W.W. (2011) Effect of maturity, processing, and storage on the furanocoumarin composition of grapefruit and grapefruit juice. *J. Food Sci.*, **76**, C543–548.
Carvalho, K., Campos, M.K.F. de, Pereira, L.F.P. and Vieira, L.G.E. (2010) Reference gene selection for real-time quantitative polymerase chain reaction normalization in "Swingle" citrumelo under drought stress. *Anal. Biochem.*, **402**, 197–199.
Chegrani-Conan, C. (2009) *Les agrumes : citron, orange, pamplemousse...* Anagramme., Paris: Anagramme.
Chen, C., Cancalon, P., Haun, C. and Gmitter, F. (2011) Characterization of furanocoumarin profile and inheritance toward selection of low furanocoumarin seedless grapefruit cultivars. *J Amer Soc Hort Sci*, **136**, 358–363.
Colombain, M., Goll, V., Muyard, F., Girard, C., Bévalot, F. and Richert, L. (2001) A bioassay using the human hepatoblastoma cell line HepG2 for detecting phototoxicity of furocoumarins. *Planta Med.*, **67**, 644–646.

Conn, E.E. and Stumpf, W. eds. (1981) *The biochemistry of plants : a comprehensive treatise, Secondary plant products.* Academic Press., New York.
Coqueret, V. (2013) *Recherche et caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des furocoumarines chez les Citrus*. Nancy.
Corazza-Nunes, M.J., Machado, M.A., Nunes, W.M.C., Cristofani, M. and Targon, M.L.P.N. (2002) Assessment of genetic variability in grapefruits (Citrus paradisi Macf.) and pummelos (C. maxima (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica*, **126**, 169–176.
Costa, M.A., Bedgar, D.L., Moinuddin, S.G.A., et al. (2005) Characterization in vitro and in vivo of the putative multigene 4-coumarate:CoA ligase network in Arabidopsis: syringyl lignin and sinapate/sinapyl alcohol derivative formation. *Phytochemistry*, **66**, 2072–2091.
Costa, R., Russo, M., Grazia, S. De, Grasso, E., Dugo, P. and Mondello, L. (2014) Thorough investigation of the oxygen heterocyclic fraction of lime (Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle) juice. *J. Sep. Sci.*, **37**, 792–797.
Cravotto, G., Nano, G.M., Palmisano, G. and Tagliapietra, S. (2001) An asymmetric approach to coumarin anticoagulants via hetero-Diels–Alder cycloaddition. *Tetrahedron Asymmetry*, **12**, 707–709.
Curk, F. (2014) *Citrus gene pool organization and nuclear genomic interspecific admixture of cultivated citrus*. Corsica, France.
Curk, F., Ancillo, G., Ollitrault, F., Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.-P., Garcia-Lor, A., Navarro, L. and Ollitrault, P. (2015) Nuclear species-diagnostic SNP markers mined from 454 amplicon sequencing reveal admixture genomic structure of modern citrus varieties. *PloS One*, **10**, e0125628.
Czapek, F. (1921) *Biochemie der pflanzen* G. Fischer., Jena.
Dardalhon, M., Massy, B. de, Nicolas, A. and Averbeck, D. (1998) Mitotic recombination and localized DNA double-strand breaks are induced after 8-methoxypsoralen and UVA irradiation in Saccharomyces cerevisiae. *Curr. Genet.*, **34**, 30–42.
Diesperger, H., Müller, C.R. and Sandermann, H. (1974) Rapid isolation of a plant microsomal fraction by Mg2+--precipitation. *FEBS Lett.*, **43**, 155–158.
Duangkaew, P., Pethuan, S., Kaewpa, D., Boonsuepsakul, S., Sarapusit, S. and Rongnoparut, P. (2011) Characterization of mosquito CYP6P7 and CYP6AA3: differences in substrate preference and kinetic properties. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **76**, 236–248.
Dugo, G., Tranchida, P.Q., Cotroneo, A., Dugo, P., Bonaccorsi, I., Marriott, P., Shellie, R. and Mondello, L. (2004) Advanced and innovative chromatographic techniques for the study of citrus essential oils. *Flavour Fragr. J*, **20**, 249–264.
Dugo, P., Mondello, L., Dugo, L., Stancanelli, R. and Dugo, G. (2000) LC-MS for the identification of oxygen heterocyclic compounds in citrus essential oils. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **24**, 147–154.
Dugo, P., Piperno, A., Romeo, R., Cambria, M., Russo, M., Carnovale, C. and Mondello, L. (2009) Determination of oxygen heterocyclic components in Citrus products by HPLC with UV detection. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 6543–6551.
Dugrand, A., Olry, A., Duval, T., Hehn, A., Froelicher, Y. and Bourgaud, F. (2013) Coumarin and furanocoumarin quantitation in citrus peel via ultraperformance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS). *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 10677–10684.
Durand-Hulak, M., Dugrand, A., Duval, T., Bidel, L.P.R., Jay-Allemand, C., Froelicher, Y., Bourgaud, F. and Fanciullino, A.-L. (2015) Mapping the genetic and tissular diversity of 64 phenolic compounds in Citrus species using a UPLC-MS approach. *Ann. Bot.*, **115**, 861–877.
Eckermann, C., Schröder, G., Eckermann, S., Strack, D., Schmidt, J., Schneider, B. and

Schröder, J. (2003) Stilbenecarboxylate biosynthesis: a new function in the family of chalcone synthase-related proteins. *Phytochemistry*, **62**, 271–286.
Fahey, J.W., Zalcmann, A.T. and Talalay, P. (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, **56**, 5–51.
Fang, D., Krueger, R.R. and Roose, M.L. (1998) Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **123**, 612–617.
FAO (2015) FAOSTAT 2015. Available at: http://faostat3.fao.org/home/E [Accessed May 6, 2015].
FDA (2015) Method validation guidelines. Available at: http://www.fda.gov [Accessed May 20, 2015].
Federici, C.T., Fang, D.Q., Scora, R.W. and Roose, M.L. (1998) Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.*, **96**, 812–822.
Fraga, B.M. (2012) Phytochemistry and chemotaxonomy of Sideritis species from the Mediterranean region. *Phytochemistry*, **76**, 7–24.
Frérot, E. and Decorzant, E. (2004) Quantification of total furocoumarins in Citrus oils by HPLC coupled with UV, fluorescence, and mass detection. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6879–6886.
Friedman, M. (2002) Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5751–5780.
Frisvad, J.C., Andersen, B. and Thrane, U. (2008) The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycol. Res.*, **112**, 231–240.
Froelicher, Y., Mouhaya, W., Bassene, J.-B., Costantino, G., Kamiri, M., Luro, F., Morillon, R. and Ollitrault, P. (2011) New universal mitochondrial PCR markers reveal new information on maternal citrus phylogeny. *Tree Genet. Genomes*, **7**, 49–61.
Gahalaut, P., Mishra, N., Soodan, P.S. and Rastogi, M.K. (2014) Effect of Oral PUVAsol on the Quality of Life in Indian Patients Having Chronic Plaque Psoriasis. *Dermatol. Res. Pract.*, **2014**, 291586.
Garcia-Lor, A., Curk, F., Snoussi-Trifa, H., Morillon, R., Ancillo, G., Luro, F., Navarro, L. and Ollitrault, P. (2013) A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the "true citrus fruit trees" group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species. *Ann. Bot.*, **111**, 1–19.
Garcia-Molina, M.O.T.S., Munoz-Munoz, J.L., Garcia-Molina, F., Rodriguez-Lopez, J.N. and Garcia-Canovas, F. (2013) Study of umbelliferone hydroxylation to esculetin catalyzed by polyphenol oxidase. *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 1140–1145.
Geskin, L. (2007) ECP versus PUVA for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Skin Ther. Lett.*, **12**, 1–4.
Ginglinger, J.-F., Boachon, B., Höfer, R., et al. (2013) Gene coexpression analysis reveals complex metabolism of the monoterpene alcohol linalool in Arabidopsis flowers. *Plant Cell*, **25**, 4640–4657.
Gorgus, E., Lohr, C., Raquet, N., Guth, S. and Schrenk, D. (2010) Limettin and furocoumarins in beverages containing citrus juices or extracts. *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 93–98.
Gotoh, O. (1992) Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J. Biol. Chem.*, **267**, 83–90.
Grande, L.A., Mendez, R.D., Krug, R.T. and Verschuyl, E.-J. (2009) Attention--grapefruit! *Lancet*, **373**, 1222.
Gravot, A., Larbat, R., Hehn, A., Lièvre, K., Gontier, E., Goergen, J.L. and Bourgaud,

F. (2004) Cinnamic acid 4-hydroxylase mechanism-based inactivation by psoralen derivatives: cloning and characterization of a C4H from a psoralen producing plant Ruta graveolens exhibiting low sensitivity to psoralen inactivation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **422**, 71–80.

Groppo, M., Pirani, J.R., Salatino, M.L.F., Blanco, S.R. and Kallunki, J.A. (2008) Phylogeny of Rutaceae based on twononcoding regions from cpDNA. *Am. J. Bot.*, **95**, 985–1005.

Groves, J.T. (2003) The bioinorganic chemistry of iron in oxygenases and supramolecular assemblies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 3569–3574.

Hamerski, D. and Matern, U. (1988a) Biosynthesis of psoralens. Psoralen 5-monooxygenase activity from elicitor-treated Ammi majus cells. *FEBS Lett.*, **239**, 263–265.

Hamerski, D. and Matern, U. (1988b) Elicitor-induced biosynthesis of psoralens in Ammi majus L. suspension cultures. Microsomal conversion of demethylsuberosin into (+)marmesin and psoralen. *Eur. J. Biochem. FEBS*, **171**, 369–375.

Harrison, T.L., Zangerl, A.R., Schuler, M.A. and Berenbaum, M.R. (2001) Developmental variation in cytochrome P450 expression in Papilio polyxenes in response to xanthotoxin, a hostplant allelochemical. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **48**, 179–189.

Hehmann, M., Lukacin, R., Ekiert, H. and Matern, U. (2004) Furanocoumarin biosynthesis in Ammi majus L. Cloning of bergaptol O-methyltransferase. *Eur. J. Biochem.*, **271**, 932–40.

Heinke, R., Franke, K., Michels, K., Wessjohann, L., Ali, N.A.A. and Schmidt, J. (2012) Analysis of furanocoumarins from Yemenite Dorstenia species by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom. JMS*, **47**, 7–22.

Hellín, P., Manso, A., Flores, P. and Fenoll, J. (2010) Evolution of aroma and phenolic compounds during ripening of "superior seedless" grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 6334–6340.

Höfer, R., Boachon, B., Renault, H., et al. (2014) Dual function of the cytochrome P450 CYP76 family from Arabidopsis thaliana in the metabolism of monoterpenols and phenylurea herbicides. *Plant Physiol.*, **166**, 1149–1161.

Hopkins, W.G. (2003) *Physiologie végétale, 2e édition* De Boeck., Bruxelles.

Hughes, R.K., Domenico, S. De and Santino, A. (2009) Plant cytochrome CYP74 family: biochemical features, endocellular localisation, activation mechanism in plant defence and improvements for industrial applications. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.*, **10**, 1122–1133.

Huyez-Levrat, M. (2010) *Le cahier des techniques de l'INRA : Validation des méthodes d'analyse quantitative par le profil d'exactitude*, Available at: https://www6.inra.fr/cahier_des_techniques/Presentation [Accessed May 20, 2015].

Hu, Y., Zhang, J., Jia, H., et al. (2014) Lateral organ boundaries 1 is a disease susceptibility gene for citrus bacterial canker disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **111**, E521–529.

Hwang, S.-L., Shih, P.-H. and Yen, G.-C. (2012) Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, **60**, 877–885.

Innocenti, G., Acqua, F. Dall' and Caporale, G. (1983) The role of 5,8-dihydroxypsoralen in the biosynthesis of isopimpinellin. *Phytochemistry*, **22**, 2207–2209.

Iranshahi, M., Askari, M., Sahebkar, A. and Adjipavlou-Litina, D. (2009) Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and lipoxygenase inhibitory activities of the prenylated coumarin umbelliprenin. *DARU J. Pharm. Sci.*, **17**, 99–103.

Ishihara, M., Toda, H., Sunagane, N. and Ohta, T. (2011) Furanocoumarins contents and cytochrome P450 3A (CYP3A) inhibitory activities of various processed fruit peel products: outflow of 6',7'-dihydroxybergamottin during processing treatment of peel. *Yakugaku Zasshi*, **131**, 679–684.

Jacquemond, C., Curk, F. and Heuzet, M. (2013) *Les clémentiniers et autres petits*

agrumes Quae., Versailles: Quae.
Jan, S., Parween, T., Siddiqi, T.O. and Mahmooduzzafar, null (2012) Enhancement in furanocoumarin content and phenylalanine ammonia lyase activity in developing seedlings of Psoralea corylifolia L. in response to gamma irradiation of seeds. *Radiat. Environ. Biophys.*, **51**, 341–347.
Jensen, N.B., Zagrobelny, M., Hjernø, K., Olsen, C.E., Houghton-Larsen, J., Borch, J., Møller, B.L. and Bak, S. (2011) Convergent evolution in biosynthesis of cyanogenic defence compounds in plants and insects. *Nat. Commun.*, **2**, 273.
Jones, P. and Vogt, T. (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta*, **213**, 164–174.
Kaneko, M., Hwang, E.I., Ohnishi, Y. and Horinouchi, S. (2003) Heterologous production of flavanones in Escherichia coli: potential for combinatorial biosynthesis of flavonoids in bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 456–461.
Karamat, F., Olry, A., Doerper, S., Vialart, G., Ullmann, P., Werck-Reichhart, D., Bourgaud, F. and Hehn, A. (2012) CYP98A22, a phenolic ester 3'-hydroxylase specialized in the synthesis of chlorogenic acid, as a new tool for enhancing the furanocoumarin concentration in Ruta graveolens. *BMC Plant Biol.*, **12**, 152.
Karamat, F., Olry, A., Munakata, R., Koeduka, T., Sugiyama, A., Paris, C., Hehn, A., Bourgaud, F. and Yazaki, K. (2014) A coumarin-specific prenyltransferase catalyzes the crucial biosynthetic reaction for furanocoumarin formation in parsley. *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **77**, 627–638.
Kawashima, A. and Satta, Y. (2014) Substrate-dependent evolution of cytochrome P450: rapid turnover of the detoxification-type and conservation of the biosynthesis-type. *PloS One*, **9**, e100059.
Kim, D.W., Curtis-Long, M.J., Yuk, H.J., Wang, Y., Song, Y.H., Jeong, S.H. and Park, K.H. (2014) Quantitative analysis of phenolic metabolites from different parts of Angelica keiskei by HPLC-ESI MS/MS and their xanthine oxidase inhibition. *Food Chem.*, **153**, 20–27.
Kim, G.S., Park, H.J., Woo, J.H., et al. (2012) Citrus aurantium flavonoids inhibit adipogenesis through the Akt signaling pathway in 3T3-L1 cells. *BMC Complement. Altern. Med.*, **12**, 31.
Kim, J. and DellaPenna, D. (2006) Defining the primary route for lutein synthesis in plants: the role of Arabidopsis carotenoid beta-ring hydroxylase CYP97A3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 3474–3479.
Kimura, Y., Ito, H., Ohnishi, R. and Hatano, T. (2010) Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 429–435.
Kitamura, N., Kohtani, S. and Nakagaki, R. (2005) Molecular aspects of furocoumarin reactions: Photophysics, photochemistry, photobiology, and structural analysis. *J. Photochem. Photobiol. C*, **6**, 168–185.
Köhler, F.E. (1887) *Medicinal plants*, Gera: Gustav Pabst.
Koukol, J. and Conn, E.E. (1961) The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of Hordeum vulgare. *J. Biol. Chem.*, **236**, 2692–2698.
Krieger, C. (2014) *Identification moléculaire et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle sous-famille de cytochromes P450, CYP71AZ, impliquée dans la synthèse de furanocoumarines et de coumarines chez Pastinaca sativa.* Vandoeuvre-Lès-Nancy: Université de Lorraine.
Kruse, T., Ho, K., Yoo, H.D., Johnson, T., Hippely, M., Park, J.H., Flavell, R. and Bobzin, S. (2008) In planta biocatalysis screen of P450s identifies 8-methoxypsoralen as a substrate for the CYP82C subfamily, yielding original chemical structures. *Chem. Biol.*, **15**, 149–56.

Larbat, R., Hehn, A., Hans, J., Schneider, S., Jugde, H., Schneider, B., Matern, U. and Bourgaud, F. (2009) Isolation and functional characterization of CYP71AJ4 encoding for the first P450 monooxygenase of angular furanocoumarin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **284**, 4776–4785.

Larbat, R., Kellner, S., Specker, S., Hehn, A., Gontier, E., Hans, J., Bourgaud, F. and Matern, U. (2007) Molecular cloning and functional characterization of psoralen synthase, the first committed monooxygenase of furanocoumarin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **282**, 542–554.

Leclerc, D., Darwich-Codore, H. and Rozen, R. (2003) Characterization of a pseudogene for murine methylenetetrahydrofolate reductase. *Mol. Cell. Biochem.*, **252**, 391–395.

Lee, H.-H. (2014) Mutational analysis of CYP21A2 gene and CYP21A1P pseudogene: long-range PCR on genomic DNA. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, **1167**, 275–287.

Lee, J.-H., Kim, Y.-G., Cho, H.S., Ryu, S.Y., Cho, M.H. and Lee, J. (2014) Coumarins reduce biofilm formation and the virulence of Escherichia coli O157:H7. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.*, **21**, 1037–1042.

Li, H. and Poulos, T.L. (1997) The structure of the cytochrome p450BM-3 haem domain complexed with the fatty acid substrate, palmitoleic acid. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 140–146.

Li, L., Chang, Z., Pan, Z., Fu, Z.-Q. and Wang, X. (2008) Modes of heme binding and substrate access for cytochrome P450 CYP74A revealed by crystal structures of allene oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 13883–13888.

Lin, C.-Y., Wang, J.P., Li, Q., et al. (2015) 4-Coumaroyl and caffeoyl shikimic acids inhibit 4-coumaric acid:coenzyme A ligases and modulate metabolic flux for 3-hydroxylation in monolignol biosynthesis of Populus trichocarpa. *Mol. Plant*, **8**, 176–187.

Lin, H., Kenaan, C. and Hollenberg, P.F. (2012) Identification of the residue in human CYP3A4 that is covalently modified by bergamottin and the reactive intermediate that contributes to the grapefruit juice effect. *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 998–1006.

Liu, C., Jiang, D., Cheng, Y., Deng, X., Chen, F., Fang, L., Ma, Z. and Xu, J. (2013) Chemotaxonomic study of Citrus, Poncirus and Fortunella genotypes based on peel oil volatile compounds--deciphering the genetic origin of Mangshanyegan (Citrus nobilis Lauriro). *PloS One*, **8**, e58411.

Liu, S., Lv, Y., Wan, X.-R., Li, L.-M., Hu, B. and Li, L. (2014) Cloning and expression analysis of cDNAs encoding ABA 8'-hydroxylase in peanut plants in response to osmotic stress. *PloS One*, **9**, e97025.

Liu, Y., Heying, E. and Tanumihardjo, S.A. (2012) History, global distribution, and nutritional importance of Citrus fruits. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **11**, 530–545.

Li, W., Schuler, M.A. and Berenbaum, M.R. (2003) Diversification of furanocoumarin-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases in two papilionids: Specificity and substrate encounter rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100 Suppl 2**, 14593–14598.

Li, W., Zangerl, A.R., Schuler, M.A. and Berenbaum, M.R. (2004) Characterization and evolution of furanocoumarin-inducible cytochrome P450s in the parsnip webworm, Depressaria pastinacella. *Insect Mol. Biol.*, **13**, 603–613.

Lohr, C., Raquet, N. and Schrenk, D. (2010) Application of the concept of relative photomutagenic potencies to selected furocoumarins in V79 cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA*, **24**, 558–566.

Lown, K.S., Bailey, D.G., Fontana, R.J., Janardan, S.K., Adair, C.H., Fortlage, L.A., Brown, M.B., Guo, W. and Watkins, P.B. (1997) Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J. Clin. Invest.*, **99**, 2545–2553.

Luro, F., Venturini, N., Costantino, G., Paolini, J., Ollitrault, P. and Costa, J. (2012) Genetic and chemical diversity of citron (Citrus medica L.) based on nuclear and cytoplasmic

markers and leaf essential oil composition. *Phytochemistry*, **77**, 186–196.
Lv, H.-N., Wang, S., Zeng, K.-W., Li, J., Guo, X.-Y., Ferreira, D., Zjawiony, J.K., Tu, P.-F. and Jiang, Y. (2015) Anti-inflammatory coumarin and benzocoumarin derivatives from Murraya alata. *J. Nat. Prod.*, **78**, 279–285.
Mabberley, D.J. (1997) A classification for edible citrus (rutaceae). *Telopea*, **7**, 167–172.
Macheix, J.-J., Fleuriet, A. and Jay-Allemand, C. (2005) *Les composés phénoliques des végétaux, Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique.* Presses polytechniques et universitaires romandes., Lausanne.
Manthey, J.A. and Buslig, B.S. (2005) Distribution of furanocoumarins in grapefruit juice fractions. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 5158–5163.
Mao, W., Schuler, M.A. and Berenbaum, M.R. (2007) Cytochrome P450s in Papilio multicaudatus and the transition from oligophagy to polyphagy in the Papilionidae. *Insect Mol. Biol.*, **16**, 481–490.
Marley, K.A., Larson, R.A. and Davenport, R. (1995) Alternative mechanisms of psoralen phototoxicity. In *Light-activated pest control*. American Chemical Society, pp. 179–188.
Maruyama, K., Urano, K., Yoshiwara, K., et al. (2014) Integrated analysis of the effects of cold and dehydration on rice metabolites, phytohormones, and gene transcripts. *Plant Physiol.*, **164**, 1759–1771.
Massot, B. (2001) *Production de méthoxy-psoralènes par des cultures in vitro de tiges feuillées de Ruta graveolens*. Vandoeuvre-Lès-Nancy: Institut National Polytechnique de Lorraine.
Matsumoto, S., Mizutani, M., Sakata, K. and Shimizu, B.-I. (2012) Molecular cloning and functional analysis of the ortho-hydroxylases of p-coumaroyl coenzyme A/feruloyl coenzyme A involved in formation of umbelliferone and scopoletin in sweet potato, Ipomoea batatas (L.) Lam. *Phytochemistry*, **74**, 49–57.
McDonnell, A.M. and Dang, C.H. (2013) Basic review of the cytochrome P450 system. *J. Adv. Pract. Oncol.*, **4**, 263–268.
McKey, D. (1974) Adaptive patterns in alkaloid physiology. *Am. Nat.*, 305–320.
Mehrotra, R., Bhalothia, P., Bansal, P., Basantani, M.K., Bharti, V. and Mehrotra, S. (2014) Abscisic acid and abiotic stress tolerance – Different tiers of regulation. *J. Plant Physiol.*, **171**, 486–496.
Messer, A., Raquet, N., Lohr, C. and Schrenk, D. (2012) Major furocoumarins in grapefruit juice II: phototoxicity, photogenotoxicity, and inhibitory potency vs. cytochrome P450 3A4 activity. *Food Chem. Toxicol.*, **50**, 756–760.
Miftakhova, A.F., Burasheva, G.S., Abilov, Z.A., Ahmad, V.U. and Zahid, M. (2001) Coumarins from the aerial part of Halocnemum strobilaceum. *Fitoterapia*, **72**, 319–321.
Mignotte, B. and Vayssiere, J.L. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem. FEBS*, **252**, 1–15.
Mikami, M., Toki, S. and Endo, M. (2015) Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Mol. Biol.*
Milesi, S. (2001) *Etude de la production de furocoumarines par la Rue officinale (Ruta graveolens L.) : cultures de plantes au champ et cultures in vitro*. Vandoeuvre-Lès-Nancy: Institut National Polytechnique de Lorraine.
Miller, K.G., Poole, C.F. and Pawlowski, T.M.P. (1996) Classification of the botanical origin of cinnamon by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Chromatographia*, **42**, 639–646.
Mittapelli, S.R., Maryada, S.K., Khareedu, V.R. and Vudem, D.R. (2014) Structural organization, classification and phylogenetic relationship of cytochrome P450 genes in Citrus clementina and Citrus sinensis. *Tree Genet. Genomes*, **10**, 399–409.
Miyake, Y., Murakami, A., Sugiyama, Y., Isobe, M., Koshimizu, K. and Ohigashi, H.

(1999) Identification of coumarins from lemon fruit (Citrus limon) as inhibitors of in vitro tumor promotion and superoxide and nitric oxide generation. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3151–3157.

Miyazawa, M., Tsukamoto, T., Anzai, J. and Ishikawa, Y. (2004) Insecticidal effect of phthalides and furanocoumarins from Angelica acutiloba against Drosophila melanogaster. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4401–4405.

Mizutani, M. and Ohta, D. (2010) Diversification of P450 genes during land plant evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **61**, 291–315.

Momtaz, K. and Fitzpatrick, T.B. (1998) The benefits and risks of long-term PUVA photochemotherapy. *Dermatol. Clin.*, **16**, 227–234.

Morikawa, T., Mizutani, M., Aoki, N., et al. (2006) Cytochrome P450 CYP710A encodes the sterol C-22 desaturase in Arabidopsis and tomato. *Plant Cell*, **18**, 1008–1022.

Munakata, R., Inoue, T., Koeduka, T., et al. (2012) Characterization of coumarin-specific prenyltransferase activities in Citrus limon peel. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1389–1393.

Munakata, R., Inoue, T., Koeduka, T., et al. (2014) Molecular cloning and characterization of a geranyl diphosphate-specific aromatic prenyltransferase from lemon. *Plant Physiol.*, **166**, 80–90.

Murakami, A., Kuki, W., Takahashi, Y., Yonei, H., Nakamura, Y., Ohto, Y., Ohigashi, H. and Koshimizu, K. (1997) Auraptene, a citrus coumarin, inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in ICR mouse skin, possibly through suppression of superoxide generation in leukocytes. *Jpn. J. Cancer Res. Gann*, **88**, 443–452.

Myung, K., Manthey, J.A. and Narciso, J.A. (2008) Binding of furanocoumarins in grapefruit juice to Aspergillus niger hyphae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 401–407.

Myung, K., Narciso, J.A. and Manthey, J.A. (2008) Removal of furanocoumarins in grapefruit juice by edible fungi. *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 12064–12068.

Naganuma, M., Hirose, S., Nakayama, Y., Nakajima, K. and Someya, T. (1985) A study of the phototoxicity of lemon oil. *Arch. Dermatol. Res.*, **278**, 31–36.

Nelson, D.R. (1999) Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch. Biochem. Biophys.*, **369**, 1–10.

Nelson, D.R. (2015) Cytochrome P450 homepage. Available at: http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html [Accessed April 27, 2015].

Ner-Gaon, H., Halachmi, R., Savaldi-Goldstein, S., Rubin, E., Ophir, R. and Fluhr, R. (2004) Intron retention is a major phenomenon in alternative splicing in Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.*, **39**, 877–885.

Nicolosi, E., Deng, Z.N., Gentile, A., Malfa, S.L., Continella, G. and Tribulato, E. (2000) Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.*, **100**, 1155–1166.

Nicolosi, E., Malfa, S. La, Otmani, M. El-, Negbi, M. and Goldschmidt, E.E. (2005) The Search for the Authentic Citron (Citrus medica L.): Historic and Genetic Analysis. *HortScience*, **40**, 1963–1968.

Ogawa, K., Kawasaki, A., Yoshida, T., Nesumi, H., Nakano, M., Ikoma, Y. and Yano, M. (2000) Evaluation of auraptene content in citrus fruits and their products. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1763–1769.

Ohnishi, A., Matsuo, H., Yamada, S., Takanaga, H., Morimoto, S., Shoyama, Y., Ohtani, H. and Sawada, Y. (2000) Effect of furanocoumarin derivatives in grapefruit juice on the uptake of vinblastine by Caco-2 cells and on the activity of cytochrome P450 3A4. *Br. J. Pharmacol.*, **130**, 1369–77.

Ohta, T., Maruyama, T., Nagahashi, M., Miyamoto, Y., Hosoi, S., Kiuchi, F., Yamazoe,

Y. and Tsukamoto, S. (2002) Paradisin C: a new CYP3A4 inhibitor from grapefruit juice. *Tetrahedron*, **58**, 6631–6635.
Ojala, T., Vuorela, P., Kiviranta, J., Vuorela, H. and Hiltunen, R. (1999) A bioassay using Artemia salina for detecting phototoxicity of plant coumarins. *Planta Med.*, **65**, 715–718.
Okano, K., Heng, H., Trevisanato, S., Tyers, M. and Varmuza, S. (1997) Genomic organization and functional analysis of the murine protein phosphatase 1c gamma (Ppp1cc) gene. *Genomics*, **45**, 211–215.
O'Keefe, D.P. and Harder, P.A. (1991) Occurrence and biological function of cytochrome P450 monooxygenases in the actinomycetes. *Mol. Microbiol.*, **5**, 2099–2105.
Omura, T. and Sato, R. (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370–2378.
Ortuno, A., Arcas, M.C., Botia, J.M., Fuster, M.D. and Rio, J.A. Del (2002) Increasing resistance against Phytophthora citrophthora in tangelo nova fruits by modulating polymethoxyflavones levels. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2836–2839.
Paine, M.F., Widmer, W.W., Hart, H.L., Pusek, S.N., Beavers, K.L., Criss, A.B., Brown, S.S., Thomas, B.F. and Watkins, P.B. (2006) A furanocoumarin-free grapefruit juice establishes furanocoumarins as the mediators of the grapefruit juice-felodipine interaction. *Am. J. Clin. Nutr.*, **83**, 1097–1105.
Paquette, S.M., Bak, S. and Feyereisen, R. (2000) Intron-exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous cytochrome P450 genes of Arabidopsis thaliana. *DNA Cell Biol.*, **19**, 307–317.
Parrish, J.A., Fitzpatrick, T.B., Tanenbaum, L. and Pathak, M.A. (1974) Photochemotherapy of Psoriasis with Oral Methoxsalen and Longwave Ultraviolet Light. *N. Engl. J. Med.*, **291**, 1207–1211.
Pathak, M.A., Fellman, J.H. and Kaufman, K.D. (1960) The effect of structural alterations on the erythemal activity of furocoumarins: psoralens. *J. Invest. Dermatol.*, **35**, 165–183.
Pathak, M.A. and Fitzpatrick, T.B. (1992) The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. *J. Photochem. Photobiol. B*, **14**, 3–22.
Podlaha, O. and Zhang, J. (2001) Pseudogenes and their evolution. In *Encyclopedia of life sciences*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
Podust, L.M. and Sherman, D.H. (2012) Diversity of P450 enzymes in the biosynthesis of natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **29**, 1251–1266.
Pompon, D., Louerat, B., Bronine, A. and Urban, P. (1996) Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol.*, **272**, 51–64.
Praloran, J.C. (1971) *Les Agrumes*, Paris: G.-P. Maisonneuve & Larose.
Prats, E., Rubiales, D. and Jorrín, J. (2002) Acibenzolar-S-methyl-induced resistance to sunflower rust (Puccinia helianthi) is associated with an enhancement of coumarins on foliar surface. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **60**, 155–162.
Prince, M., Campbell, C.T., Robertson, T.A., Wells, A.J. and Kleiner, H.E. (2006) Naturally occurring coumarins inhibit 7,12-dimethylbenz[a]anthracene DNA adduct formation in mouse mammary gland. *Carcinogenesis*, **27**, 1204–1213.
Pronin, A.V., Danilov, L.L., Narovlyansky, A.N. and Sanin, A.V. (2014) Plant polyisoprenoids and control of cholesterol level. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **62**, 31–39.
Qiu, S., Sun, H., Zhang, A.-H., Xu, H.-Y., Yan, G.-L., Han, Y. and Wang, X.-J. (2014) Natural alkaloids: basic aspects, biological roles, and future perspectives. *Chin. J. Nat. Med.*, **12**, 401–406.
Quaak, M.S.W., Martens, H., Hassing, R.-J., Beek-Nieuwland, Y. van and Genderen, P.J.J. van (2012) The sunny side of lime. *J. Travel Med.*, **19**, 327–328.
Rajniak, J., Barco, B., Clay, N.K. and Sattely, E.S. (2015) A new cyanogenic metabolite in

Arabidopsis required for inducible pathogen defence. *Nature*, **525**, 376–379.
Ramesh, B. and Pugalendi, K.V. (2005) Impact of umbelliferone on erythrocyte redox status in STZ-diabetic rats. *Yale J. Biol. Med.*, **78**, 133–140.
Raquet, N. and Schrenk, D. (2014) Application of the equivalency factor concept to the phototoxicity and -genotoxicity of furocoumarin mixtures. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.*, **68**, 257–266.
Raven, P., Losos, J., Johnson, G. and Singer, S. (2007) *Biologie 7e édition* De Boeck., Bruxelles.
Razavi, S.M. and Zarrini, G. (2010) Bioactivity of aviprin and aviprin-3''-O-glucoside, two linear furanocoumarins from Apiaceae. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **36**, 392–5.
Renault, H., Bassard, J.-E., Hamberger, B. and Werck-Reichhart, D. (2014) Cytochrome P450-mediated metabolic engineering: current progress and future challenges. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **19**, 27–34.
Rio, J.A. Del, Arcas, M.C., Benavente-Garcia, O. and Ortuno, A. (1998) Citrus polymethoxylated flavones can confer resistance against Phytophthora citrophthora, Penicillium digitatum, and Geotrichum species. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4423–4428.
Roberts, M.F. and Wink, M. (1998) *Alkaloids: biochemistry, ecology, and medicinal applications* Plenum Press., New York: Springer Science & Business Media.
Robl, M., Robl, R., Marinoni, L.P., Abagge, K.T. and Carvalho, V.O. (2013) Assemble the puzzle: bizarre-looking lesions. *Arch Child*, **98**, 915.
Rodriguez-Concepcion, M. and Stange, C. (2013) Biosynthesis of carotenoids in carrot: an underground story comes to light. *Arch. Biochem. Biophys.*, **539**, 110–116.
Row, E.C., Brown, S.A., Stachulski, A.V. and Lennard, M.S. (2006) Design, synthesis and evaluation of furanocoumarin monomers as inhibitors of CYP3A4. *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 1604–1610.
Royer, M., Larbat, R., Bot, J. Le, Adamowicz, S. and Robin, C. (2013) Is the C:N ratio a reliable indicator of C allocation to primary and defence-related metabolisms in tomato? *Phytochemistry*, **88**, 25–33.
Sapam, R., Agrawal, S. and Dhali, T.K. (2012) Systemic PUVA vs. narrowband UVB in the treatment of vitiligo: a randomized controlled study. *Int. J. Dermatol.*, **51**, 1107–1115.
Sasaki, M., Meguro, F., Kumazawa, E., Fujita, H., Kakishima, H. and Sakata, T. (1988) Evidence for uptake of 8-methoxypsoralen and 5-methoxypsoralen by cellular nuclei. *Mutat. Res.*, **197**, 51–58.
Sashidhara, K.V., Kumar, A., Chatterjee, M., Rao, K.B., Singh, S., Verma, A.K. and Palit, G. (2011) Discovery and synthesis of novel 3-phenylcoumarin derivatives as antidepressant agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 1937–1941.
Schlatter, J., Zimmerli, B., Dick, R., Panizzon, R. and Schlatter, C. (1991) Dietary intake and risk assessment of phototoxic furocoumarins in humans. *Food Chem. Toxicol.*, **29**, 523–530.
Scora, R.W. (1975) On the history and origin of citrus. *Bull Torrey Bot Club*, **102**, 369–375.
Scott, J.G., Liu, N. and Wen, Z. (1998) Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comp. Biochem. Physiol. C*, **121**, 147–155.
Seigler, D.S. (1998) *Plant secondary metabolism*, Boston, MA: Springer US.
Seki, H., Sawai, S., Ohyama, K., et al. (2011) Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin. *Plant Cell*, **23**, 4112–4123.
Shapiro, M.B. and Senapathy, P. (1987) RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 7155–7174.
Sharma, R., Negi, D.S., Shiu, W.K.P. and Gibbons, S. (2006) Characterization of an

insecticidal coumarin from Boenninghausenia albiflora. *Phytother. Res. PTR*, **20**, 607–609.
Shim, S.C. and kim, Y.Z. (1983) The photocycloaddition reaction of 8-methoxypsoralen with olefins. *J. Photochem.*, **23**, 83–92.
Sono, M., Roach, M.P., Coulter, E.D. and Dawson, J.H. (1996) Heme-containing oxygenases. *Chem. Rev.*, **96**, 2841–2888.
Spino, C., Dodier, M. and Sotheeswaran, S. (1998) Anti-HIV coumarins from Calophyllum seed oil. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 3475–3478.
Stanjek, V., Piel, J. and Boland, W. (1999) Biosynthesis of furanocoumarins: mevalonate-independent prenylation of umbelliferone in Apium graveolens (Apiaceae). *Phytochemistry*, **50**, 1141–1146.
Stavri, M. and Gibbons, S. (2005) The antimycobacterial constituents of dill (Anethum graveolens). *Phytother. Res. PTR*, **19**, 938–941.
Sun, J. (2007) D-Limonene: safety and clinical applications. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.*, **12**, 259–264.
Swingle, W. and Reece, P. (1967) The botany of Citrus and its wild relatives. In W. Reuther, H. Webber, and L. Batchelor, eds. *The citrus industry*. Berkeley, CA: University of California, pp. 190–430.
Taguchi, null, Fujikawa, null, Yazawa, null, Kodaira, null, Hayashida, null, Shimosaka, null and Okazaki, null (2000) Scopoletin uptake from culture medium and accumulation in the vacuoles after conversion to scopolin in 2,4-D-treated tobacco cells. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.*, **151**, 153–161.
Tanaka, K., Barmina, O. and Kopp, A. (2009) Distinct developmental mechanisms underlie the evolutionary diversification of Drosophila sex combs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 4764–4769.
Tanaka, T. (1933) Acclimatation des Citrus hors de leur pays d'origine. *Rev. Bot. Appliq.*, 389–398.
Tanaka, T. (1977) Fundamental discussion of Citrus classification. *Stud. Citrol.*, **14**, 1–6.
Teutsch, H.G., Hasenfratz, M.P., Lesot, A., Stoltz, C., Garnier, J.M., Jeltsch, J.M., Durst, F. and Werck-Reichhart, D. (1993) Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 4102–4106.
Thompson, H.J., Sharma, S.K. and Brown, S.A. (1978) O-methyltransferases of furanocoumarin biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **188**, 272–281.
Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R. and Fernie, A.R. (2013) The evolution of phenylpropanoid metabolism in the green lineage. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **48**, 123–152.
Uesawa, Y. and Mohri, K. (2006a) The use of heat treatment to eliminate drug interactions due to grapefruit juice. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 2274–2278.
Uesawa, Y. and Mohri, K. (2006b) UV-irradiated grapefruit juice loses pharmacokinetic interaction with nifedipine in rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1286–1289.
Urban, P., Mignotte, C., Kazmaier, M., Delorme, F. and Pompon, D. (1997) Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related Arabidopsis thaliana NADPH-cytochrome P450 reductases with P450 CYP73A5. *J. Biol. Chem.*, **272**, 19176–19186.
Vandermolen, K.M., Cech, N.B., Paine, M.F. and Oberlies, N.H. (2013) Rapid quantitation of furanocoumarins and flavonoids in grapefruit juice using ultra-performance liquid chromatography. *Phytochem. Anal.*, **24**, 654–660.
Venugopala, K.N., Rashmi, V. and Odhav, B. (2013) Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed Res. Int.*, **2013**, 963248.
Veronese, F.M., Schiavon, O., Bevilacqua, R., Bordin, F. and Rodighiero, G. (1981) The

effect of psoralens and angelicins on proteins in the presence of UV-A irradiation. *Photochem. Photobiol.*, **34**, 351–354.
Vialart, G., Hehn, A., Olry, A., et al. (2012) A 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase from Ruta graveolens L. exhibits p-coumaroyl CoA 2′-hydroxylase activity (C2′H): a missing step in the synthesis of umbelliferone in plants. *Plant J.*, **70**, 460–470.
Voo, S.S., Grimes, H.D. and Lange, B.M. (2012) Assessing the biosynthetic capabilities of secretory glands in Citrus peel. *Plant Physiol.*, **159**, 81–94.
Wamer, W.G., Timmer, W.C., Wei, R.R., Miller, S.A. and Kornhauser, A. (1995) Furocoumarin-photosensitized hydroxylation of guanosine in RNA and DNA. *Photochem. Photobiol.*, **61**, 336–340.
Wang, C.M., Zhou, W., Li, C.X., Chen, H., Shi, Z.Q. and Fan, Y.J. (2009) Efficacy of osthol, a potent coumarin compound, in controlling powdery mildew caused by Sphaerotheca fuliginea. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **11**, 783–91.
Wangensteen, H., Molden, E., Christensen, H. and Malterud, K.E. (2003) Identification of epoxybergamottin as a CYP3A4 inhibitor in grapefruit peel. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **58**, 663–668.
Wang, H., Conchou, L., Bessière, J.-M., Cazals, G., Schatz, B. and Imbert, E. (2013) Flower color polymorphism in Iris lutescens (Iridaceae): Biochemical analyses in light of plant–insect interactions. *Phytochemistry*, **94**, 123–134.
Wang, S., Zhang, S., Wang, W., Xiong, X., Meng, F. and Cui, X. (2015) Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Rep.*
Weng, J.-K., Akiyama, T., Bonawitz, N.D., Li, X., Ralph, J. and Chapple, C. (2010) Convergent evolution of syringyl lignin biosynthesis via distinct pathways in the lycophyte Selaginella and flowering plants. *Plant Cell*, **22**, 1033–1045.
Wen, Z., Pan, L., Berenbaum, M.R. and Schuler, M.A. (2003) Metabolism of linear and angular furanocoumarins by Papilio polyxenes CYP6B1 co-expressed with NADPH cytochrome P450 reductase. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **33**, 937–947.
Werck-Reichhart, D. and Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.*, **1**, 3003.1–3003.9.
Widelski, J., Popova, M., Graikou, K., Glowniak, K. and Chinou, I. (2009) Coumarins from Angelica lucida L.--antibacterial activities. *Molecules*, **14**, 2729–34.
Widmer, W. (2005) One tangerine/grapefruit hybrid (tangelo) contains trace amounts of furanocoumarins at a level too low to be associated with grapefruit/drug interactions. *J. Food Sci.*, **70**, c419–c422.
Wiesner, M., Schreiner, M. and Zrenner, R. (2014) Functional identification of genes responsible for the biosynthesis of 1-methoxy-indol-3-ylmethyl-glucosinolate in Brassica rapa ssp. chinensis. *BMC Plant Biol.*, **14**, 124.
Wilkinson, G.R. (2005) Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N. Engl. J. Med.*, **352**, 2211–2221.
Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E.F. and McRee, D.E. (2000) Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol. Cell*, **5**, 121–131.
Wittstock, U. and Gershenzon, J. (2002) Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**, 300–307.
Yang, S.-M., Shim, G.Y., Kim, B.-G. and Ahn, J.-H. (2015) Biological synthesis of coumarins in Escherichia coli. *Microb. Cell Factories*, **14**, 65.
Yeh, T.-F., Lin, C.-Y. and Chang, S.-T. (2014) A potential low-coumarin cinnamon substitute: Cinnamomum osmophloeum leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 1706–1712.
Yu, X., Gao, X., Zhu, Z., Cao, Y., Zhang, Q., Tu, P. and Chai, X. (2014) Alkaloids from the tribe Bocconieae (papaveraceae): a chemical and biological review. *Mol. Basel Switz.*, **19**,

13042–13060.
Zangerl, A.R. and Berenbaum, M.R. (1998) Damage-inducibility of primary and secondary metabolites in the wild parsnip (Pastinaca sativa). *Chemoecology*, **8**, 187–193.
Zangerl, A.R. and Rutledge, C.E. (1996) The probability of attack and patterns of constitutive and induced defense: a test of optimal defense theory. *Am. Nat.*, **147**, 599–608.
Zheng, X., Zhang, X., Sheng, X., Yuan, Z., Yang, W., Wang, Q. and Zhang, L. (2010) Simultaneous characterization and quantitation of 11 coumarins in Radix Angelicae Dahuricae by high performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **51**, 599–605.
Zobel, A.M., Wang, J., March, R.E. and Brown, S.A. (1991) Identification of eight coumarins occurring with psoralen, xanthotoxin, and bergapten on leaf surfaces. *J. Chem. Ecol.*, **17**, 1859–1870.

Annexes

Annexes

Annexe 1. Liste des médicaments interagissant avec le pomelo.

Médicament, biodisponibilité orale associée, effets secondaires observés, risque d'occurrence, éventuels médicaments alternatifs (Bailey *et al.*, 2013).

Partie 1 :

Interacting drugs	Innate oral bioavailability*	Dose-related adverse event(s)	Predicted interaction risk†	Potential alternative agent(s)‡
Anticancer agents				
Crizotinib	Intermediate	Torsade de pointes, myelotoxicity	High	
Dasatinib	Not known	Torsade de pointes, myelotoxicity	High	Imatinib
Erlotinib	Intermediate	Myelotoxicity	High	
Everolimus	Low	Myelotoxicity, nephrotoxicity	High	
Lapatinib	Incomplete	Torsade de pointes, myelotoxicity	High	
Nilotinib	Intermediate	Torsade de pointes, myelotoxicity	High	Imatinib
Pazopanib	Incomplete	Torsade de pointes, myelotoxicity	High	Sorafenib
Sunitinib	Not known	Torsade de pointes, myelotoxicity	High	Sorafenib
Vandetanib	Not known	Torsade de pointes, myelotoxicity	High	
Venurafenib	Not known	Torsade de pointes, myelotoxicity	High	
Anti-infective agents				
Erythromycin	Intermediate	Torsade de pointes	High	Clarithromycin
Halofantrine	Low	Torsade de pointes	Very high	Doxycycline
Maraviroc	Low	Postural hypotension, syncope	Very high	Enfuvirtide
Primaquine	Intermediate	Myelotoxicity	High	Doxycycline
Quinine	Intermediate	Torsade de pointes	High	Doxycycline
Rilpivirine	Not known	Torsade de pointes	High	Nevirapine
Antilipemic agents				
Atorvastatin	Low	Rhabdomyolysis	High	Pravastatin, rosuvastatin, fluvastatin
Lovastatin	Very low	Rhabdomyolysis	Very high	Pravastatin, rosuvastatin, fluvastatin
Simvastatin	Very low	Rhabdomyolysis	Very high	Pravastatin, rosuvastatin, fluvastatin
Cardiovascular agents				
Amiodarone	Intermediate	Torsade de pointes	High	Sotalol
Apixaban	Intermediate	GI bleeding	High	Warfarin
Clopidogrel	Very low	Loss of efficacy	High	Acetylsalicylic acid
Dronedarone	Low	Torsade de pointes	Very high	Sotalol
Eplerenone	Intermediate	Hyperkalemia, serious arrhythmias	High	Spironolactone
Felodipine	Low	Hypotension, peripheral edema	Intermediate	Amlodipine
Nifedipine	Intermediate	Hypotension, peripheral edema	Intermediate	Amlodipine

Partie 2 :

Interacting drugs	Innate oral bioavailability*	Dose-related adverse event(s)	Predicted interaction risk†	Potential alternative agent(s)‡
Cardiovascular agents (continued)				
Quinidine	High	Torsade de pointes	Intermediate	
Rivaroxaban	High	GI bleeding	Intermediate	Warfarin
Ticagrelor	Intermediate	GI or kidney bleeding	High	Acetylsalicyclic acid
CNS agents				
Alfentanil (oral)	Intermediate	Respiratory depression	High	Hydromorphone, morphine
Buspirone	Very low	Dizziness, sedation	High	Oxazepam, tamazepam
Dextromethorphan	Very low	Hallucinations, somnolence	High	
Fentanyl (oral)	Intermediate	Respiratory depression	High	Hydromorphone, morphine
Ketamine (oral)	Low	Respiratory depression	Very high	Hydromorphone, morphine
Lurasidone	Low	Torsade de pointes, orthostatic hypotension, syncope	Very high	Haloperidol, risperidone olanzapine
Oxycodone	Intermediate	Respiratory depression	High	Hydromorphone, morphine
Pimozide	Intermediate	Torsade de pointes	High	Haloperidol, risperidone, olanzapine
Quetiapine	Very low	Dizziness, somnolence	High	Haloperidol, risperidone, olanzapine
Triazolam	Intermediate	Sedation	Intermediate	Alprazolam, lorazepam
Ziprasidone	Intermediate	Torsade de pointes	High	Haloperidol, risperidone olanzapine
Gastrointestinal agents				
Domperidone	Low	Torsade de pointes	Very high	Metoclopramide
Immunosuppressants				
Cyclosporine	Low	Nephrotoxicity	High	
Everolimus	Low	Myelotoxicity, nephrotoxicity	High	
Sirolimus	Low	Myelotoxicity, nephrotoxicity	High	
Tacrolimus	Low	Nephrotoxicity	High	
Urinary tract agents				
Darifenacin	Low	Urinary retention, constipation	Intermediate	
Fesoterodine	Intermediate	Urinary retention, constipation	Intermediate	
Solifenacin	High	Torsade de pointes	Intermediate	
Silodosin	Intermediate	Postural hypotension, dizziness	Intermediate	
Tamsulosin	Intermediate	Postural hypotension, dizziness	Intermediate	

Note: CNS = central nervous system, GI = gastrointestinal.
*Population average: very low < 10%, low >10%–30%, intermediate >30%–70%, high > 70%.
†Based on the seriousness of the adverse effect and adjusted for the innate oral bioavailability of the drug, which is used to determine the potential increase in systemic drug concentration. For older patients, particularly the elderly, it is recommended that grapefruit or other citrus fruits be contraindicated for drugs in the very high or high category, or that a suggested alternative noninteracting drug be employed when available.
‡Commonly prescribed drugs (Top 100 prescribed in 2011 in Canada) with the same therapeutic indication that have no or minor pharmacokinetic interaction with grapefruit or other citrus fruits.

Annexe 2. Protocole de préparation de bactéries *E. coli* GeneHogs® électrocompétentes.

Toutes les étapes décrites dans ce protocole sont effectuées en milieu stérile et avec du matériel stérile. Les centrifugations sont toutes réalisées sans le frein et à 4 °C.

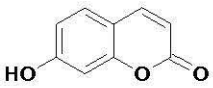
1. À partir d'un stock glycérol, étaler des bactéries *E. coli* GeneHogs® sur une boîte de milieu LB et mettre en culture à l'étuve à 37 °C pendant la nuit.
2. Le lendemain matin, ensemencer 10 mL de milieu LB liquide avec une colonie de bactéries isolée dans un tube de 50 mL. Incuber à 37 °C sous agitation.
3. Après une matinée de culture, ensemencer quatre boîtes de milieu LB : une ne contenant aucun antibiotique, une autre contenant de l'ampicilline (100 mg/L), une contenant de la kanamycine (100 mg/L) et une dernière contenant de la spectinomycine (100 mg/L). Mettre les boîtes de Pétri à incuber à 37 °C.

   NB : Cette étape permet de vérifier que les bactéries ne présentent pas de résistance aux antibiotiques et se développent correctement sur un milieu LB sans antibiotiques. Elle permet également de s'assurer que la souche de bactéries n'est pas contaminée par une autre souche (milieu LB sans antibiotiques).
4. Le lendemain matin, vérifier que les bactéries se sont correctement développées sur le milieu LB sans antibiotiques ainsi que l'absence de colonies sur les boîtes de milieu LB avec ampicilline, kanamycine et spectinomycine.
5. Ensemencer 200 mL de milieu LB avec les 10 mL de préculture de bactéries de la veille, dans un Erlenmeyer de 500 mL stérile. Incuber la culture à 37 °C sous agitation pendant 2 à 3 h, de sorte à obtenir une densité optique (DO) à 700 nm comprise entre 0,5 et 0,7.
6. Transvaser la culture dans des tubes de 50 mL stériles (quatre au total) et les placer sur la glace pendant 10 min.
7. Centrifuger les tubes à environ 2000 × g pendant 15 min puis jeter les surnageants.
8. Resuspendre les culots dans 10 mL d'eau ultrapure stérile froide sur la glace, en remuant doucement. Compléter ensuite les niveaux à 40 mL avec de l'eau ultrapure stérile.
9. Répéter les étapes 7 et 8, puis 7 de nouveau.
10. Resuspendre le culot d'un des quatre tubes de 50 mL avec 20 mL de glycérol à 10 % froid et stérile. Les 3 autres culots sont resuspendus avec ce même volume afin de tous les mélanger.
11. Centrifuger le tout à environ 2000 × g pendant 15 min puis jeter le surnageant.
12. Resuspendre le culot dans 1 mL de glycérol à 10 % froid et stérile.
13. Aliquoter par 45 µL dans de petits tubes stériles à congeler à l'azote liquide, avant de les stocker au congélateur à -80 °C.
14. Réaliser une transformation de bactéries avec un plasmide présentant un gène de résistance à l'un des trois antibiotiques, afin de vérifier qu'elles soient bien électrocompétentes. Répéter ensuite l'étape 3 avec les aliquots préparés, afin de vérifier qu'il n'y ait pas eu de contaminations au cours de la préparation des bactéries électrocompétentes.

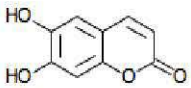
Annexe 3. Structures et caractéristiques des coumarines testées pour le criblage métabolique.

FB : Formule brute ; PM : Poids moléculaire ; C_{stock} : concentration de la solution stock de substrat. Les numéros d'identification des composés sont indiqués : numéro CAS ou numéro dans la chimiothèque nationale (CN).

Coumarines

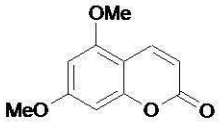


Umbelliférone
FB : $C_9H_6O_3$
PM : 162
C_{stock} : 10 mM
N° CAS : 93-35-6



Esculétine
FB : $C_9H_6O_4$
PM : 178
C_{stock} : 10 mM
N° CAS : 305-01-1

Scopolétine
FB : $C_{10}H_8O_4$
PM : 192
C_{stock} : 10 mM
N° CAS : 05-10-3067



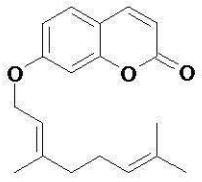
Citroptène
FB : $C_{11}H_{10}O_4$
PM : 206
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 487-06-9

6-méthoxycoumarine
FB : $C_{10}H_8O_3$
PM : 176
C_{stock} : 10 mM
N° CAS : 17372-53-1

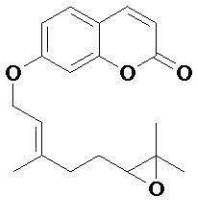
Herniarine
(7-méthoxycoumarine)
FB : $C_{10}H_8O_3$
PM : 176
C_{stock} : 10 mM
N° CAS : 531-59-9

2-méthyl-7-méthoxycoumarine
FB : $C_{11}H_{10}O_3$
PM : 190
C_{stock} : 10 mM
CN001573V

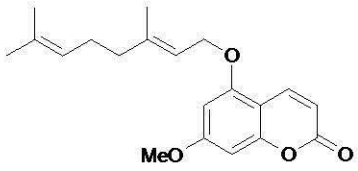
Déméthylsubérosine
FB : $C_{14}H_{14}O_3$
PM : 230
C_{stock} : 10 mM
N° CAS : 21422-04-8



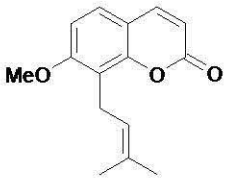
Auraptène
FB : $C_{19}H_{22}O_3$
PM : 298
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 495-02-3



Époxyauraptène
FB : $C_{19}H_{22}O_4$
PM : 314
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 36414-00-3



5-géranyloxy-7-méthoxycoumarine
FB : $C_{20}H_{24}O_4$
PM : 328
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 7380-39-4

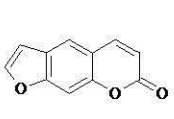


Osthol
FB : $C_{15}H_{16}O_3$
PM : 244
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 484-12-8

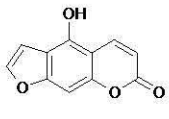
Annexe 4. Structures et caractéristiques des furocoumarines testées pour le criblage métabolique.

FB : Formule brute ; PM : Poids moléculaire ; C_{stock} : concentration de la solution stock de substrat. Les numéros d'identification des composés sont indiqués : numéro CAS ou numéro dans la chimiothèque nationale (CN).

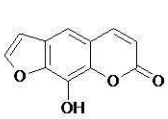
Furocoumarines



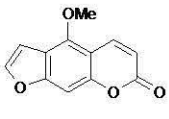
Psoralène
FB : $C_{11}H_6O_3$
PM : 186
C_{stock} : 10 mM
N° CAS : 66-97-7



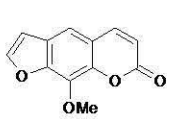
Bergaptol
FB : $C_{11}H_6O_4$
PM : 202
C_{stock} : 10 mM
N° CAS : 486-60-2



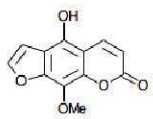
Xanthotoxol
FB : $C_{11}H_6O_4$
PM : 202
C_{stock} : 10 mM
N° CAS : 2009-24-7



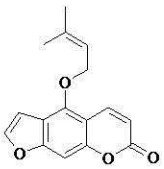
Bergaptène
FB : $C_{12}H_8O_4$
PM : 216
C_{stock} : 10 mM
N° CAS : 484-20-8



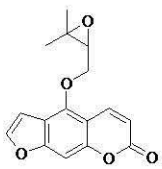
Xanthotoxine
FB : $C_{12}H_8O_4$
PM : 216
C_{stock} : 10 mM
N° CAS : 298-81-7



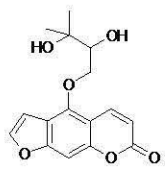
5-hydroxy-xanthotoxine
FB : $C_{12}H_8O_5$
PM : 232
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 7471-73-0



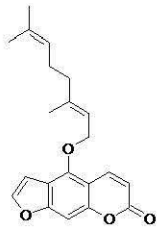
Isoimpératorine
FB : $C_{16}H_{14}O_4$
PM : 270
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 482-45-1



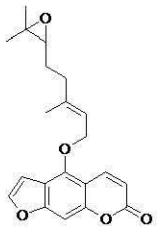
Oxypeucédanine
FB : $C_{16}H_{14}O_5$
PM : 286
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 737-52-0



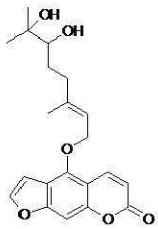
Oxypeucédanine hydrate
FB : $C_{16}H_{16}O_6$
PM : 304
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 24724-52-5



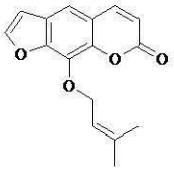
Bergamottine
FB : $C_{21}H_{22}O_4$
PM : 338
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 7380-40-7



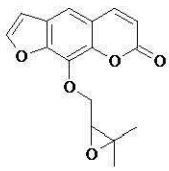
Époxybergamottine
FB : $C_{21}H_{22}O_5$
PM : 354
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 206978-14-5



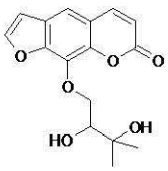
6',7'-dihydroxybergamottine
FB : $C_{21}H_{24}O_6$
PM : 372
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 145414-76-2



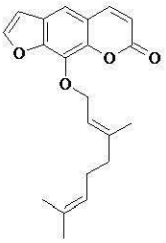
Impératorine
FB : $C_{16}H_{14}O_4$
PM : 270
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 482-44-0



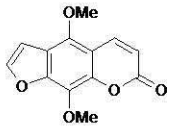
Héraclénine
FB : $C_{16}H_{14}O_5$
PM : 286
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 35740-18-2



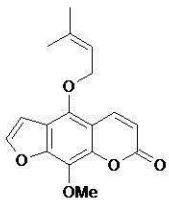
Héraclénol
FB : $C_{16}H_{16}O_6$
PM : 304
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 118407-74-2



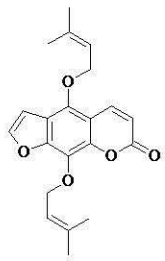
8-géranyloxypsoralène
FB : $C_{21}H_{22}O_4$
PM : 338
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 7437-55-0



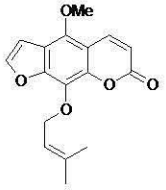
Isopimpinelline
FB : $C_{13}H_{10}O_5$
PM : 246
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 482-27-9



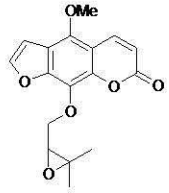
Cnidilline
FB : $C_{17}H_{16}O_5$
PM : 300
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 14348-22-2



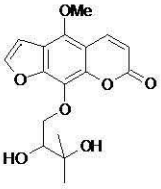
Cnidicine
FB : $C_{21}H_{22}O_5$
PM : 354
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 14348-21-1



Phelloptérine
FB : $C_{17}H_{16}O_5$
PM : 300
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 2543-94-4

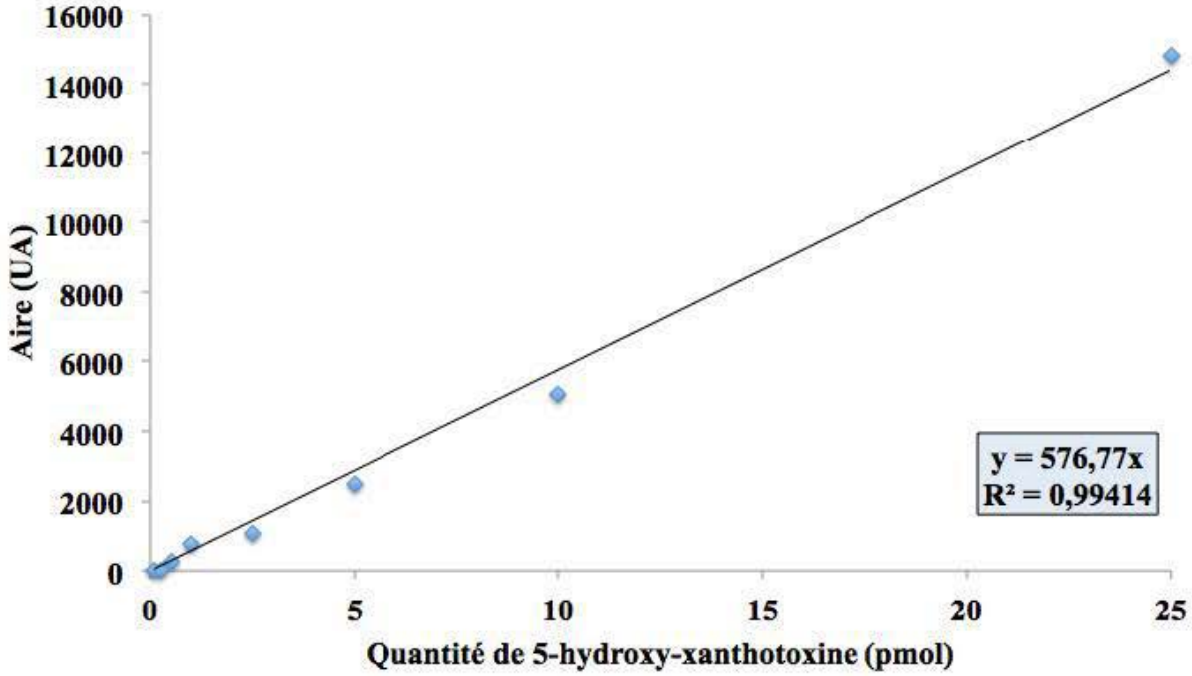


Byakangélicol
FB : $C_{17}H_{16}O_6$
PM : 316
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 61046-59-1



Byakangélicine
FB : $C_{17}H_{18}O_7$
PM : 334
C_{stock} : 1 mM
N° CAS : 19573-01-4

Annexe 5. Gamme étalon de 5-hydroxy-xanthotoxine utilisée lors de la caractérisation enzymatique de CYP82D64.



Annexe 8. Étude de dominance de la production de coumarines et furocoumarines chez les espèces secondaires de *Citrus*.

(A) Hybrides C. maxima × C. reticulata (partie 1) ; (B) Hybrides C. maxima × C. reticulata (partie 2) ; (C) Hybrides C. medica × C. reticulata ; (D) Hybrides C. micrantha × C. medica ; (E) Hybrides C. micrantha × C. reticulata. [1] Moyennes des concentrations en coumarines et furocoumarines (mg/kg poids frais) chez les taxons ancestraux. [2] Seuls les composés dont les concentrations moyennes chez le taxon ancestral produisant le plus sont supérieures à 1 mg/kg de poids frais ont été conservés. [3] Le total prend en compte toutes les coumarines et furocoumarines dosées (mêmes celles en concentrations inférieures à 1 mg/kg de poids frais). [4] L'étude de dominance n'a pas de sens si les concentrations en composés sont proches.

A

Hybrides *C. maxima* × *C. reticulata*

Coumarines et furocoumarines[2]	Pamplemousses[1]	Mandarines[1]	Clémentine Commune	Tangor Murcott	Bendiguangju	Mandarine Fortune	Orange douce Washington Navel	Orange douce Shamouti	Orange douce Hamlin	Orange douce Pineapple
Citroptène	1,81	4,10	0,59	-0,79	-0,79	-0,79	-0,39	-0,79	-0,79	1,89
Osthol	14,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,00
Auraptène	23,60	0,37	-0,01	-0,02	-0,02	0,00	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02
Époxyauraptène	44,28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bergaptol	1,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Bergaptène	10,04	4,37	-0,21	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,77	-0,02
Isoimpératorine	24,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Oxypeucédanine	14,90	0,98	0,00	-0,03	-0,03	-0,03	-0,02	-0,04	-0,03	-0,07
Oxypeucédanine hydraté	4,45	0,07	0,20	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02
Bergamottine	3,28	0,14	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04
Époxybergamottine	37,14	0,25	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01
6',7'-dihydroxybergamottine	48,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
8-géranyloxypsoralène	3,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Isopimpinelline	0,08	2,02	0,68	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	1,14
Cnidicine	3,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TOTAL[3]	236,22	12,28	-0,01	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05	-0,05	0,00

B

Hybrides *C. maxima* × *C. reticulata*

Coumarines et furocoumarines[2]	Pamplemousses[1]	Mandarines[1]	Orange amère Maroc	Orange amère Bouquetier de Nice	Orange amère Granito	Orange amère Chinotto	Pomelo Duncan	Pomelo Marsh	Pomelo Star Ruby
Citroptène	1,81	4,10	-0,79	-0,79	-0,79	-0,79	-0,25	-0,32	-0,04
Osthol	14,21	0,00	1,05	1,49	1,41	0,79	0,23	0,28	0,36
Auraptène	23,60	0,37	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	0,45	1,55	1,64
Époxyauraptène	44,28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,81	0,74
Bergaptol	1,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,97	0,00	0,00
Bergaptène	10,04	4,37	2,38	3,06	6,62	1,95	-0,22	-0,57	-0,50
Isoimpératorine	24,32	0,00	0,11	0,16	0,31	0,11	0,00	0,00	0,00
Oxypeucédanine	14,90	0,98	-0,04	-0,03	-0,02	-0,04	-0,02	-0,02	-0,03
Oxypeucédanine hydraté	4,45	0,07	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02
Bergamottine	3,28	0,14	0,07	0,18	0,30	0,14	0,55	2,04	3,99
Époxybergamottine	37,14	0,25	0,59	0,75	1,30	0,35	0,13	0,69	1,39
6',7'-dihydroxybergamottine	48,79	0,00	0,40	0,71	0,94	0,79	5,03	1,15	1,41
8-géranyloxypsoralène	3,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Isopimpinelline	0,08	2,02	-0,04	-0,04	-0,04	-0,04	0,20	0,16	0,45
Cnidicine	3,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TOTAL[3]	236,22	12,28	0,29	0,44	0,68	0,31	1,27	0,71	0,91

C

Coumarines et furocoumarines[2]	Cédrats[1]	Mandarines[1]	Hybrides *C. medica* × *C. reticulata* : Citron Rough	Lime Rangpur	Lime Rangpur jaune	Citron Volkamer
Citroptène	118,37	4,10	-0,01	0,38	0,13	0,00
Bergaptène	5,98	4,37	-1,19	0,55	-1,15	-1,25
Isoimpératorine	2,83	0,00	0,00	0,92	0,43	0,46
Oxypeucédanine	18,66	0,98	0,12	1,40	0,52	0,03
Oxypeucédanine hydrate	7,71	0,07	-0,01	2,60	0,35	0,19
Impératorine	2,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Héraclénine	7,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
Héraclénol	4,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,85
Isopimpinelline	4,58	2,02	-0,04	1,15	0,68	-0,17
Phelloptérine	7,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Byakangélicol	19,43	0,00	0,14	0,09	0,15	0,04
Byakangélicine	17,26	0,00	1,21	0,00	0,00	0,82
Cnidicine	1,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TOTAL[3]	219,82	12,28	0,11	0,56	0,15	0,10

D

Coumarines et furocoumarines[2]	Papedas[1]	Cédrats[1]	Hybrides *C. micrantha* × *C. medica* : Lime Mexicaine	Lime Giant Key	Lime Coppenrhad	Alemow	Excelsa
Citroptène	8,66	118,37	0,36	0,06	0,05	0,69	-0,01
Auraptène	2,52	0,58	-0,30	-0,30	-0,30	26,34	0,02
Bergaptol	23,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13
Bergaptène	372,80	5,98	0,00	-0,01	-0,02	0,01	0,00
Isoimpératorine	19,99	2,83	0,79	-0,07	-0,16	1,98	0,59
Oxypeucédanine	585,06	18,66	0,07	0,01	0,00	0,11	0,11
Oxypeucédanine hydrate	89,51	7,71	0,21	-0,04	-0,07	0,51	0,33
Bergamottine	35,15	0,00	0,46	1,27	0,68	0,13	0,83
Époxybergamottine	297,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,39
6',7'-dihydroxybergamottine	212,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,17
Xanthotoxol	2,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Xanthotoxine	16,37	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00	0,01
Impératorine	0,00	2,31	2,18	0,00	0,00	10,35	1,87
Héraclénine	0,00	7,87	4,32	0,82	0,00	7,81	0,26
Héraclénol	0,00	4,89	1,61	0,00	0,00	6,74	0,00
8-géranyloxypsoralène	210,50	0,00	0,23	0,12	0,08	0,07	0,05
Isopimpinelline	349,70	4,58	0,13	0,06	-0,01	0,00	0,00
Phelloptérine	6,76[4]	7,65[4]	13,51	-4,70	-6,26	38,24	4,54
Cnidiline	56,70	0,00	0,84	0,17	0,04	0,24	0,00
Byakangélicol	53,64	19,43	1,58	0,11	-0,28	1,54	0,65
Byakangélicine	0,00	17,26	0,00	0,00	0,00	1,92	0,00
Cnidicine	0,00	1,70	2,84	0,61	0,00	4,20	1,55
TOTAL[3]	2343,25	219,82	0,12	-0,02	-0,06	0,24	0,09

E

Hybride *C. micrantha* × *C. reticulata*

		Papedas[1]	Mandarines[1]	Mandarine Nasnaran
Coumarines et furocoumarines[2]	Citroptène	8,66	4,10	1,86
	Auraptène	2,52	0,37	0,48
	Bergaptol	23,70	0,00	0,75
	Bergaptène	372,80	4,37	0,11
	Isoimpératorine	19,99	0,00	2,03
	Oxypeucédanine	585,06	0,98	0,48
	Oxypeucédanine hydrate	89,51	0,07	1,51
	Bergamottine	35,15	0,14	1,59
	Époxybergamottine	297,17	0,25	0,20
	6',7'-dihydroxybergamottine	212,89	0,00	0,48
	Xanthotoxol	2,19	0,00	0,00
	Xanthotoxine	16,37	0,00	0,00
	8-géranyloxypsoralène	210,50	0,00	0,00
	Isopimpinelline	349,70	2,02	0,01
	Phelloptérine	6,76	0,00	0,00
	Cnidiline	56,70	0,00	0,00
	Byakangélicol	53,64	0,00	0,00
	TOTAL[3]	2343,25	12,28	0,32

Annexe 9. Concentration (mg/kg poids frais ± écart-type) des coumarines et furocoumarines dans les extraits de peau et de pulpe de tangelo Minneola.

La notion de « traces » signifie que le composé correspondant a pu être détecté mais pas quantifié (3 < S/N < 10).

		Tangelo Minneola	
		Peau	Pulpe
	Coumarines		
	Umbelliférone		
	Osthol		Traces
	Auraptène	0,66 ± 0,14	0,54 ± 0,22
	Époxyauraptène	Traces	
	Citroptène		
	5-géranyloxy-7-méthoxycoumarine		
	Furocoumarines		
	Psoralène		
Groupe du bergaptène	Bergaptol		
	Bergaptène		
	Isoimpératorine		
	Oxypeucédanine		
	Oxypeucédanine hydrate	Traces	Traces
	Bergamottine		
	Époxybergamottine		
	6',7'-dihydroxybergamottine		
Groupe de la xanthotoxine	Xanthotoxol		
	Xanthotoxine		
	Impératorine		
	Héraclénine		
	Héraclénol		
	8-géranyloxypsoralène		
Groupe de l'isopimpinelline	Isopimpinelline		
	Phelloptérine		
	Byakangélicol		
	Byakangélicine		
	Cnidiline		
	Cnidicine		
TOTAL (mg/kg poids frais)		0,66	0,54

Annexe 10. Séquences nucléotidiques codantes complètes des *CYP82D64* clonés chez le pomelo Ruby (*C. paradisi*) et chez le Combava (*C. hystrix*).

Les codons initiateurs sont indiqués en bleu et les codons stop en rouge. Les séquences correspondant aux queues poly histidines composées de 6 histidines sont indiquées en vert.

> *CYP82D64* de Combava

ATGGAGTTCCTATTCACAGCTGTAATAATCACTGCCCTTTTAGTCTTTGTTTCAAGAAATATGGTAA
AAAAAGCAGGGAACAAGAAGAGAGGAGCACCAGAAGCTGGTGGAGGATGGCCTGTGATAGGCCA
TCTACACCTCTTAGGAGGGCCAGAGCCCCTTCACAAAGTTTTAGGAAAAATTGCTGACAAGTACGG
ACCAATCTTGACGATCAAGGTCGGGGTACGTCGCACTTTGGTGGTGAGCAATTGGGAGATTGCTAA
AGAGTGTCTCACTACAAGTGACAAAGTCTTTGCCACCCGTCCAAAAACTGTTGCCGGGGACATATT
GTGCTACGATTCTTCCTTGCTTGGTTTTGTCCCTTATGGTCACTACTGGCGCCAGATACGCAAGATA
GCCACACTCGAGCTTCTATCAAGCTATCGGCTTGAGAGTCTCAAATATGTACGAGAATCTGAGGTG
AGAACATGTTTGAAAGAGTTATATAATCTATGGGATGCTGGTCTTGATAAAGCACCGGTGTTGGTG
GATATGAAGAAATGGTGCGAGTATGTAACCCTTAATGTGATCTTAAGGATGGTGGTTGGAAAACGA
TGCAATATTAGTATTTCACAAAAGGGAACCAGTAATGATCAAGGATGGAAAGATGAATTGTCGAG
ATTTTTTGAATTCATGGGTAAGTTGGTGGTGTCAGATGCTCTACCGTTTTTGAGATGGTTGGATATT
GGCAGAGATGAGATGTTAATGAAGAAGACAGCAAGAGAATTAGACCTTATCATGCAACGATGGTT
GGATGAGCACAGAAGGAAGGGGGATTCTGGTGATTATCAGATCAAAGGACGAGAAGACAATTTTA
TGGGCGCCATGCTTTCCATCCTCGACGATATCGGAGCACAAGAATTTCCCGGTCGTGATGCTGATA
CCATCAACAAAGCTACATGCTTGGCACTCATCCTTGGTGGCAGTGATACTACATCAGGCACCCTGA
CATGGGCCATCTCTTTACTCTTGAACAACCGCCATGCGTTGAAGAAGGCACAAGAAGAATTGGACC
AACAAGTTGGTAAGGAACGAGCAGTTGATGAGTCGGACACCCAAAACCTAGTGTATCTCCAAGCG
ATTATCAAAGAGACCCTCCGCTTGTATCCCGCGGGTCCTCTCTTAGCACCACGTGAAGCAATGGAA
GATTGCACTGTCTCTGGGTACCATGTCCCGGCTGGCACCCGGTTGATGATAAATGCTTGGAAAATT
CAAAGGGATCCAAGGGTTTGGGAAAATCCATCAGCCTTCCAACCAGAGAGATTTCTCCCAGGCTAT
GGCGCCCATGCAGATGTTGATGTTAGGGGCCAACAATTTGAACTCATTCCTTTTGGCTCTGGCCGA
CGTTCTTGCCCAGGTGCATCATCTGCTCTCCAGGTCCTTCACCTCACGCTTGCTCGACTCCTTCATGC
ATTTGAACTAGCAACCCCATTGGATCAGCCTGTTGACATGTCAGAGTCTCCTGGCTTAACCGTACCT
AAGGCCACCCCATTGAAGGTTCTCCTTTCTCCTCGCCTCCTCCCTGCCAACCCCTATGGCTTTCATC
ATCATCATCATCATTGA

> *CYP82D64* de pomelo Ruby

ATGGAGTTCCTATTCACAGCTGTAATAATCACTGCCCTTTTAGTCTTTGTTTCAAGAAATTTGGTAA
AAAAAGCAGGGAACAAGAAGAGAGGAGCACCAGAAGCTGGTGGAGGATGGCCTGTGATAGGCCA
TCTACACCTCTTAGGAGGGCCAGAGCCCCTTCACAAAGTTTTAGGAAAAATTGCTGACAAGTACGG
ACCAATCTTGACGATCAAGATGGGGGTACGTCGCACTTTGGTGGTGAGCAATTGGGAGATTGCTAA
AGAGTGTCTCACTACAAGTGACAAAGTCTTTGCCACCCGTCCAAAAACTGTTGCCGGGGACATATT
GTGCTACGATTCTTCCTTGCTTGGTTTTGTCCCTTATGGTCACTACTGGCGCCAGATACGCAAGATA
GCCACACTCGAGCTTCTATCAAGCTATCGGCTTGAGAGTCTCAAATATGTACGAGAATCTGAGGTG
AGAACTTGTTTGAAAGAGTTATATAATCTATGGGGTGCTGGTCTTGATAAAGCACCGGTGTTGGTG
GATATGAAGAAATGGTGCGAGTATGTAACCCTTAATGTGATCTTAAGGATGGTGGTTGGAAAACGA
TGCAATATTAGTATTTCACAAAAGGGAACCAGTAGTGATCAAGGATGGAAAGATGAATTGTCGAG
ATTTTTTGAATTCATGGGTAAGTTGGTGGTGTCAGATGCTCTACCGTTTTTGAGATGGTTGGATATT
GGCGGAGATGAGAGGTTAATGAAGAAGACAGCAAGAGAATTAGACCTTATCATGCAACGATGGTT
GGATGAGCACAGAAGGAAGGGGGATTCTGGTGATTATCTGATCAAAGGACGAGAAGACAATTTTA
TGGGCGCCATGCTTTCCATCCTCGACGATATCGGAGCACAAGAATTTCCCGGTCGTGATGCTGATA
CCATCAACAAAGCTACATGCTTGGCACTCATCCTTGGTGGCAGTGATACTACATCAGGCACCCTGA
CATGGGCCATCTCTTTACTCTTGAACAACCGCCATGCGTTGAAGAAGGCACAAGAAGAATTGGACC
AACAAGTTGGTAAGGAACGAGCAGTTGATGAGTCGGACACCCAAAACCTAGTGTATCTCCAAGCG
ATTATCAAAGAGACCCTCCGCTTGTATCCCGCGGGTCCTCTCTTAGCACCACGTGAAGCAATGGAA
GATTGCACTGTCTCTGGGTACCATGTCCCGGCTGGCACCCGCTTGATGATAAATGCTTGGAAAATT
CAAAGGGATCCAAGGGTTTGGGAAACTCCATCAGCCTTCCAACCAGAGAGATTTCTCCCAGGCCAT
GGTGCCCATGCAGATGTTGATGTTAGGGGCCAACAATTTGAACTCATTCCTTTTGGCTCTGGCCGAC
GTTCTTGCCCAGGTGCATCATCTGCTCTCCAGGTCCTTCACCTCACGCTTGCTCGACTCCTTCATGC
ATTTGAACTAGCAACCCCATTGGATCAGCCTGTTGACATGTCAGAGTCTCCTGGCTTAACCATACCT
AAGGCCACCCCATTGAAGGTTCTCCTTTCTCCTCGCCTCCTCGCTGCCAACCCCTATGGCTTTCATC
ATCATCATCATCATTGA

Annexe 11. Concentration (mg/kg poids frais ± écart-type) des coumarines et furocoumarines dans les extraits de flavédo, d'albédo et de pulpe de pomelo Ruby à différents stades de maturité.

La notion de « traces » signifie que le composé correspondant a pu être détecté mais pas quantifié (3 < S/N < 10). L'identification de la 5-géranyloxy-7-méthoxycoumarine dans les échantillons est indiquée par « Détectable ».

		Jeunes fruits			Fruits à un stade intermédiaire			Fruits mûrs		
		Flavédo	Albédo	Pulpe	Flavédo	Albédo	Pulpe	Flavédo	Albédo	Pulpe
	Coumarines									
	Umbelliférone	Traces		Traces						
	Osthol	10,76 ± 1,29	0,42 ± 0,36	0,36 ± 0,04	11,34 ± 0,33	0,29 ± 0,11	0,26 ± 0,04	1,87 ± 1,25	0,06 ± 0,06	0,06 ± 0,05
	Auraptène	221,27 ± 22,54	4,29 ± 3,38	12,55 ± 5,84	151,43 ± 14,92	1,56 ± 0,56	6,16 ± 1,24	62,98 ± 37,52	1,49 ± 0,51	1,93 ± 1,89
	Epoxyauraptène	409,45 ± 67,97	5,76 ± 5,74	74,68 ± 24,67	229,16 ± 11,04	2,65 ± 0,33	31,05 ± 4,12	106,37 ± 107,19	1,20 ± 0,62	6,85 ± 5,42
	Citroptène	0,10 ± 0,03	Traces	0,04 ± 0,01	0,15 ± 0,03	Traces	0,03 ± 0,01			
	5-géranyloxy-7-méthoxycoumarine	Détectable			Détectable			Détectable		
	Furocoumarines									
	Psoralène	1,43 ± 0,04	0,24 ± 0,12	188,67 ± 59,50	1,65 ± 0,78	0,28 ± 0,03	9,55 ± 5,72	Traces	Traces	0,04 ± 0,02
Groupe du bergaptène	Bergaptol			58,71 ± 5,26			21,52 ± 1,40			2,07 ± 0,63
	Bergaptène	5,85 ± 0,72	0,30 ± 0,08	124,55 ± 10,00	6,73 ± 0,33	0,25 ± 0,04	46,68 ± 25,29	1,07 ± 0,89	0,08 ± 0,14	0,41 ± 0,52
	Isoimpératorine			0,60 ± 0,19			0,98 ± 0,33			0,02 ± 0,03
	Oxypeucédanine			0,56 ± 0,09			0,21 ± 0,05			
	Oxypeucédanine hydrate			1,11 ± 0,25			0,75 ± 0,24			0,06 ± 0,01
	Bergamottine	14,08 ± 1,27	0,44 ± 0,27	153,64 ± 24,40	10,34 ± 0,40	0,19 ± 0,07	94,04 ± 26,02	5,86 ± 2,62	0,14 ± 0,10	5,22 ± 4,26
	Epoxybergamottine	99,88 ± 13,22	4,96 ± 5,07	40,33 ± 18,64	61,38 ± 4,02	4,03 ± 1,10	31,89 ± 5,12	28,16 ± 13,41	Traces	1,41 ± 0,9
	6',7'-dihydroxybergamottine	285,60 ± 47,00	12,38 ± 5,49	804,83 ± 63,60	230,65 ± 43,36	6,10 ± 2,05	342,89 ± 76,81	73,90 ± 53,97	2,38 ± 2,43	60,43 ± 64,50
Groupe de la xanthotoxine	Xanthotoxol									0,11 ± 0,10
	Xanthotoxine			5,70 ± 1,57			0,92 ± 0,37			
	Impératorine									
	Héraclénine									
	Héraclénol									
	8-géranyloxypsoralène	0,73 ± 0,15		7,97 ± 4,12	0,52 ± 0,06		2,34 ± 0,71	0,63 ± 0,49		1,74 ± 1,85
Groupe de l'isopimpinelline	5-hydroxy-xanthotoxine			3,76 ± 0,61			2,11 ± 0,51			Traces
	Isopimpinelline			2,32 ± 0,21	0,98 ± 0,20		1,08 ± 0,16	Traces		0,05 ± 0,03
	Phelloptérine			0,96 ± 0,04			0,31 ± 0,09			
	Byakangélicol									
	Byakangélicine									
	Cnidilline									
	Cnidicine									
TOTAL (mg/kg poids frais)		1049,15	28,79	1481,34	704,33	15,35	592,77	280,84	5,35	80,40

Annexe 12. Séquences nucléotidiques codantes complètes des *CYP71CE1* clonés chez l'orange douce (*C. sinensis*) et le pomelo Ruby (*C. paradisi*).

Les codons initiateurs sont indiqués en bleu et les codons stop en rouge. Les séquences correspondant aux queues poly histidines composées de 6 histidines sont indiquées en vert.

> *CYP71CE1* d'orange douce

ATGATTTCTCAATTTTTCTTCCTTCTCTTGTTAATTACAACCTCATCATTTGTGTTAATATTATTGATC
AAGCAGAAAACTAGTAAAGCTCAAGCAACCAGGCTCCCTCCTGGTCCTTGGAAGCTCCCACTTATA
GGAAATCTGCACCAACTTACCGGGGACTCACCCCATGTATCGCTGCAAAAACTTTCAAACGAATAC
GGACCCCTCATGTTCTTGCAACTTGGCTCACTCCCTACTCTAGTGATTTCCTCAGCTGACGTTGCCA
GAGACATCTTCAGAACCCATGATCTGATTTTTTCAGGTAGGCCAGAGTTATATGCTGCTAAAATCTT
CAGTTACAACTGCAGTAACATAGCTTTTACTCCATATGGCGAGTACTGGAGAGAGATCAGGAAGAT
AGCAATCTTGGAATTACTTGGTTCAAAGAGAGTCCAATCATTCCAGGCAGTGAGAAATGAAGAAG
TGGCGGATATGATTAAGATCATAGCTCGATCATCAGCAGGACCGACTGATCTCAGCAGATTGATAT
TTCTGCTAGCAAATAACATCATATGCCGTGTCACCTTCGGTAGAAAATACGACAGCGAAGCGGATA
CTGGGACAACGGGGTTTGATGTCTTGATGCGGGAAATGCAGGCCGTAGTGGCGGAGTCCAGTATTG
CAGATTTTTTTTCCCTGGATGGGATGGCTTGACAAGTTTAATGGCCGAGAAGCAAGAGTAATGAAG
ATTTTCAGAGAACTTGACAGATTTTATGATGAAGAAATATTACAGCAACACCTTGACCCTAGAAGG
CCTAAACCTGAACACGAAGATCTTGTCGATGTACTTGTTCGAATTCAAAAGGATTCAAGTCAAGCG
GTAGCCTTAAGCAATGAACAAATCAAGAGCCTCCTCACGGACATATTTGTTGCGGGGACCGATACA
TCTTCGGCCACGTTGGGTTGGACAATGACCGAGTTTATCAGAAATCCATCCGTGATGAGAAGGGCA
CAAAATGAAGTAAGAGGAGTCGTTAAGGGAAGAGAGGTGGTGGAAGAAAGCGATATTTCCGAACT
GATGTACCTCAAGTTAGTTGTAAAGGAAGCACTGAGACTTCATCCACCAGCGCCGTTGCTAGTCCC
CAGAGAAACTACTGAGGATTGCAGGGTAGGAGAATACGAAATTCCTTCTGGGACAAGGGTGCTTA
TTAATGCAAAGGCGATAGCAACAGACCCTGAGCACTGGGAACATCCATTTGAGTTTCGACCCGAA
AGGTTCTTGAATAGCTCAATCGATTTGAAGGGAAACAACTTTGAGTTGATACCATTTGGAGTAGGC
AGGAGGGGATGTCCTGGAATGAATTTTGCCATGCCATTAATTGAGCTTGCCCTTGCGAATTTACTG
CATCGTTTTGATTGGGAATTGCCACCAGGGATGAGAATTGAAGATTTGGATATGGAAGAAGCGCCT
GGGATGACAATGCACAAGAAAAACTCCTCTTTGCCTAGTCTCCATCATCATCATCATCATTAA

> *CYP71CE1* de pomelo Ruby

ATGATTTCTCAATTTTTCTTCCTTCTCTTGTTAATTACAACCTCATCATTTGTGTTAATATTATTGATC
AAGCAGAAAACTAGTAAAGCTCAAGCAACCAGGCTCCCTCCTGGTCCTTGGAAGCTCCCACTTATA
GGAAATCTGCACCAACTTACCGGGGACTCACCCCATGTATCGCTGCAAAAACTTTCAAACGAATAC
GGACCCCTCATGTTCTTGCAACTTGGCTCACTCCCTACTCTAGTGATTTCCTCAGCTGACGTTGCCA
GAGACATCTTCAGAACCCATGATCTTATTTTTTCAGGTAGGCCAGAGTTATATGCTGCTAAAATCTT
CAGTTACAACTGCAGTAACATAGCTTTTGCTCCATATGGCGAGTACTGGAGAGAGATCAGGAAGAT
AGCAATCTTGGAATTACTTGGTTCAAAGAGAGTCCAATCATTCCAGGCAGTGAGAAATGAAGAAG
TGGCGGATATGATTAAGATCATAGCTCGATCATCAGCAGGACCGACTGATCTCAGCAGATTGATAT
TTCTGCTAGCAAATAACATCATATGCCGTGTCACCTTCGGTAGAAAATACGACAGCGAAGCGGATA
CTGGGACAACGGGGTTTGATGTCTTGATGCGGGAAATGCAGGCCGTAGTGGCGGAGTCCAGTATTG
CAGATTTTTTTTCCCTGGATGGGATGGCTTGACAAGTTTAATGGCCGAGAAGCAAGAGTAATGAAG
ATTTTCAGAGAACTTGACAGATTTTATGATGAAGAAATATTACAGCAACACCTTGACCCTAGAAGG
CCTAAACCTGAACACGAAGATCTTGTCGATGTACTTGTTCGAATTCAAAAGGATTCAAGTCAAGCG
GTAGCCTTAAGCAATGAACAAATCAAGAGCCTCCTCACGGACATATTTGTTGCGGGGACCGATACA
TCTTCGGCCACGTTGGTTTGGACAATGACCGAGCTTATCAGAAATCCATCCGTGATGAGAAGGGCA
CAAAATGAAGTAAGAGGAGTCGTTAAGGGAAGAGAGGTGGTGGAAGAAAGCGATATTTCCGAACT
GATGTACCTCAAGTTAGTTGTAAAGGAAGCACTGAGACTTCATCCACCAGCGCCGTTGCTAGTCCC
CAGAGAAACTACTGAGGATTGCAGGGTAGGAGAATAAAGGGTGCTTATTAATGCAAAGGCGATAG
CAACAGACCCTGAGCACTGGGAACATCCATTTGAGTTTCGACCCGAAAGGTTCTTGAATAGCTCAA
TCGATTTGAAGGGAAACAACTTTGAGTTGATACCATTTGGAGTAGGCAGGAGGGGATGTCCTGGAA
TGAATTTTGCCATGCCATTAATTGAGCTTGCCCTTGCGAATTTACTGCATCGTTTTGATTGGAAATT
GCCACCAGGGATGAGAATTGAAGATTTGGATATGGAAGAAGCGCCTGGGATGACAATGCACAAGA
AAACTCCTCTTTGCCTAGTCTCCATCATCATCATCATCATTAA

Annexe 13. Séquence nucléotidique codante complète de *CYP82C46* clonée chez l'orange amère ou bigarade (*C. aurantium*).

Le codon initiateur est indiqué en bleu et le codon stop en rouge. La séquence correspondant à la queue poly histidines composée de 6 histidines est indiquée en vert.

> *CYP82C46* de bigarade

ATGGAATTCTCCCTTCAGCTTCAAGCAATCATATGCTTCTGTGCGCTTCTTGCTGCTATTATCTGCCT
CTATGTGGCTACAAACACTACCAATAGGAACAGAAAGAGAGGCAGCAGGCCACCAGAGCCGGAG
GGAGCATGGCCTTTTATCGGTCACCTTCATCTCCTCGAAAAGAACCAGCTGCTACATCAAACACTT
GGGAAGATGGCTGACAAGTATGGAAAAGCCTTCATGATCCGCCTTGGAATTCGTCAAGCGCTAGTG
ATTAGCAGCTGGGAAGTGGCAAAAGAATGTTTCACCACCAATGACAAGCTCTTCTCCTCACGTCCA
AAATTCTTAGCAGTGAAGCTCATGGGTTATGACCATGCCATGCTGGGCTTTGCTCCTTACGGACCAT
ATTGGCGCAATATTAGGAAATTAGCCACGGTTGAGCTTCTCTCAAATCATCAGCTTGAGCTGATCA
AGCATGTTCGTGACATTGAAACCAAAATTTTCATTAAGGAGTTGTACGAACTATGTGTGAAAAATG
GAGGCCTTGTTGACGTGGAGATGAAGGAAAGGTTTGGGGACTTGGCAATGAACATTATATTGAGA
GTGATTGCTGGTAAAAGATTTTTTGGCCGTGACACAAATGCTGATGATCAGGATTCAAGACAATGC
CAGAAGGCTTTGGGCAATTTCTTTTACCTAGTAGGGTTACTTTTGCCCTCGGATAACATTCCATTTC
TTGGTTGGTTAGATGTTGTGAACGGATATACAGGTCAAATGAAGAAAACAGCTAAGGAGTTGGAC
ACTCTGTTTGGTAGGTTGGTGCACGAGCATCGTCATAAGAGACTCAACGAGAGCATCAAGGAAGA
GGAGAAAGACCTCATTGATGTCATGGTGTCTGTTCTGGATGATGGTAAGACTTCTGCTGAGGATGC
CGATACTGTCATTAAGTCCACTTGCTTGAGCCTTATATTAGGAGGCAATGACACTACAGTGGTCAC
TCTTACATGGGCACTGTCTCTACTATTGAACAATCACCATGTGCTGAAAAAAGCACAAGATGAGCT
CAGTATCCATGCTGGAAACAATCGGCAAGTTGAGGAATCTGATATAAAGAACCTGATATACTTGCA
AGCAATTGTCAAAGAAACATTGAGATTATACCCTGCACTTCCACTTTCAGCTCCACGTGAGGCCAT
GGAGGATTGCATCATTGGAGGCTTCCACATCCCAGCAGGCACACGACTTATAGTTAACTTGTGGAA
GATGCATCGTGATCCCAGCATATGGGCAAACCCTTCAGAATTTATACCTGAGAGGTTCCTAAATGA
AAATGCCAATTTGGAAGTCAAGGGTCAGGATTTTGAATTTTTACCATTTGGTTCTGGTAGAAGGAA
GTGTCCAGGAATCTCATTCGCTCTTCAAGTACTGCACTTGACCTTAGCACGCCTGCTTCATGCATTC
GAGTTAGGGACAGTTTCAGACACATTAGTTGACATGCGTGAAAGCCCTGGGATGACTGTTCCTAAA
GCAACAGCACTGGAGGTTACCCTTACCCCAAGACTGCCTTCCAAGCTATATGTT**CATCATCATCAT**
CATCATTGA

Annexe 14. Pourcentages d'identité et de similarité entre les séquences protéiques des CYP82C46 et CYP82D64 de *Citrus*.

Les pourcentages d'identité (en rose) et de similarité (en bleu) ont été déterminés en utilisant le logiciel BioEdit (matrice de similarité BLOSUM62). *C. aurantium* (Ca), *C. clementina* (Cc), *C. paradisi* (Cp), *C. hystrix* (Ch).

	CYP82C46 Ca	CYP82D64 Cc	CYP82D64 Cp	CYP82D64 Ch
CYP82C46 Ca	ID	51,3 %	50,7 %	51,5 %
CYP82D64 Cc	68,3 %	ID	97,5 %	97,5 %
CYP82D64 Cp	67,4 %	98,3 %	ID	97,5 %
CYP82D64 Ch	68,1 %	99,1 %	98,5 %	ID

Liste des publications

Articles dans des journaux internationaux à comité de lecture :

Dugrand, A., Olry, A., Duval, T., Hehn, A., Froelicher, Y. and Bourgaud, F. (2013) Coumarin and furanocoumarin quantitation in citrus peel via ultraperformance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS). *J. Agric. Food Chem.*, 61, 10677-10684.

Dugrand-Judek, A., Olry, A., Hehn, A., Costantino, G., Ollitrault, P., Froelicher, Y. and Bourgaud, F. The distribution of coumarins and furanocoumarins in *Citrus* species closely matches *Citrus* phylogeny and reflects the organization of biosynthetic pathways. En cours d'évaluation pour *PLoS One*.

Durand-Hulak, M., Dugrand, A., Duval, T., Bidel, L. P. R., Jay-Allemand, C., Froelicher, Y., Bourgaud, F. and Fanciullino, A.-L. (2015) Mapping the genetic and tissular diversity of 64 phenolic compounds in *Citrus* species using a UPLC–MS approach. *Ann. Bot.*, 115, 861-877.

Munakata, R., Inoue, T., Koeduka, T., Karamat, F., Olry, A., Sugiyama, A., Takanashi, K., Dugrand, A., Froelicher, Y., Tanaka, R., Uto, Y., Hori, H., Azuma, J.-I., Hehn, A., Bourgaud, F. and Yazaki, K. (2014) Molecular cloning and characterization of a geranyl diphosphate-specific aromatic prenyltransferase from lemon. *Plant Physiol.*, 166, 80-90.

Communications nationales :

Présentations orales :

Dugrand, A., Olry, A., Duval, T., Hehn, A., Froelicher, Y. et Bourgaud, F. (2014) Création d'une méthode UPLC-MS de quantification de coumarines et furocoumarines dans la peau d'agrumes. Présentation effectuée lors du 8ème Congrès Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biologie Végétale du 25 au 27 juin 2014 à Tours.

Dugrand, A., Olry, A., Duval, T., Coqueret, V., Froelicher, Y., Hehn, A. et Bourgaud, F. (2015) Identification de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des furocoumarines chez les agrumes. Présentation effectuée lors des 3èmes journées du réseau META-SP « Métabolismes Spécialisés des Plantes » les 15 et 16 janvier 2015 à Tours.

Par voie d'affiche :

Dugrand, A., Olry, A., Duval, T., Hehn, A., Froelicher, Y. et Bourgaud, F. (2014) Création d'une méthode UPLC-MS de quantification de coumarines et furocoumarines dans

la peau d'agrumes. 8ème Congrès Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biologie Végétale du 25 au 27 juin 2014 à Tours.

Dugrand, A., Olry, A., Coqueret, V., Froelicher, Y., Bourgaud, F. et Hehn, A. (2014) Détermination de gènes candidats impliqués dans la synthèse de furocoumarines chez les agrumes. 11ème édition du séminaire de l'école doctorale RP2E sur le thème « Ressources végétales et animales… Quelles perspectives ? », le 16 janvier 2014 à Vandœuvre-Lès-Nancy.

Contribution à l'étude phytochimique et moléculaire de la synthèse des coumarines et furocoumarines chez diverses variétés d'agrumes du genre *Citrus*

Les coumarines et furocoumarines sont des phytoalexines synthétisées par certaines familles de plantes (ex : Rutacées dont font partie les agrumes), pour se défendre contre les bioagresseurs. Les furocoumarines peuvent être toxiques pour l'homme, lorsqu'elles sont combinées à certains médicaments : c'est l'effet pomelo.

Aujourd'hui, la plupart des cytochromes P450 impliqués dans la synthèse des furocoumarines chez les Apiacées, ont déjà été caractérisés. En revanche, malgré l'importance économique des agrumes, nous en savons très peu sur la voie de biosynthèse des coumarines et furocoumarines chez ces plantes.

Dans ce travail, nous avons créé, optimisé et validé une méthode d'analyse en chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse (UPLC-MS), pour identifier et quantifier 28 coumarines et furocoumarines dans la peau et la pulpe d'agrumes. Cette méthode nous a permis de chémotyper 62 variétés d'agrumes, distinguées par leur faible ou forte capacité de production de ces composés. En parallèle, un travail de bioinformatique sur des banques publiques d'ADN génomique d'agrumes, a permis d'identifier sept gènes présentant de fortes homologies de séquences avec ceux intervenant dans la synthèse des furocoumarines chez *Pastinaca sativa* (*CYP71*) et chez *Arabidopsis thaliana* (*CYP82*). Une analyse quantitative de leur niveau d'expression chez des agrumes, a montré que quatre d'entre eux étaient plus fortement exprimés chez les fruits fortement producteurs de coumarines et furocoumarines. Le clonage de ces gènes et leur expression hétérologue chez la levure, a révélé la fonction de CYP82D64 de pomelo et de Combava, qui hydroxyle la xanthotoxine pour donner la 5-hydroxy-xanthotoxine.

La synthèse des coumarines et furocoumarines chez les agrumes, ainsi mieux appréhendée, nous a permis de proposer un schéma de sélection variétale visant à abaisser les taux de ces composés chez les *Citrus*. Nous avons aussi montré l'évolution convergente des *CYP71* et *CYP82* dans leur synthèse chez les Apiacées et les Rutacées respectivement. La découverte du premier cytochrome P450 de *Citrus* intervenant dans la production de ces composés, ouvre de nouvelles perspectives quant à l'élucidation de leur voie de biosynthèse chez les agrumes.

Mots clés : coumarines, furocoumarines, UPLC-MS, *Citrus*, effet pomelo, cytochrome P450, xanthotoxine, xanthotoxine-5-monooxygénase, évolution convergente.

Contribution to the phytochemical and molecular study of the synthesis of coumarins and furanocoumarins in various citrus varieties in the *Citrus* genus

Coumarins and furanocoumarins are phytoalexines synthesized by some plant families (e.g. Rutaceæ that include citrus), to defend themselves against bioaggressors. Furanocoumarins can be toxic for humans, when combined with some drugs: this is the grapefruit juice effect.

Nowadays, most of the cytochrome P450s involved in the furanocoumarin synthesis in Apiaceæ, have already been characterized. However, despite the economical importance of citrus, a little is known about the coumarins and furanocoumarins pathway in these plants.

In this work, we created, optimized and validated an analytical method by ultra high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS), to identify and quantitate 28 coumarins and furanocoumarins in citrus peel and pulp. This method allowed us to chemotype 62 citrus varieties, distinguished by their low or high capacity to produce these compounds. In parallel, a bioinformatic work on public banks of genomic DNA from citrus, allowed to identify seven genes with high sequence homologies with those involved in the synthesis of furanocoumarins in *Pastinaca sativa* (*CYP71*) and in *Arabidopsis thaliana* (*CYP82*). A quantitative analysis of their expression level in citrus showed that four of them were more expressed in high coumarins and furanocoumarins producing fruits. The cloning of these genes and their heterologous expression in yeast, revealed the function of grapefruit and Combava CYP82D64, which catalyzes the hydroxylation of xanthotoxin in 5-hydroxy-xanthotoxin.

The synthesis of coumarins and furanocoumarins in citrus, then better apprehended, allowed us to propose a breeding scheme aiming at decreasing the levels of these compounds in *Citrus*. We also showed the convergent evolution of *CYP71* and *CYP82* in their synthesis in Apiaceæ and in Rutaceæ respectively. The discovery of the first cytochrome P450 from *Citrus* involved in the production of these compounds, opens up new prospects for the elucidation of their biosynthetic pathway in citrus.

Keywords: coumarins, furanocoumarins, UPLC-MS, *Citrus*, grapefruit juice effect, cytochrome P450, xanthotoxin, xanthotoxin-5-monooxygenase, convergent evolution.