

Université de Strasbourg
Ecole Doctorale 414 – Sciences de la Vie et de la Santé

Dossier d’Habilitation à Diriger des Recherches

Compréhension moléculaire de la synthèse de métabolites spécialisés chez les plantes – des gènes à leurs fonctions et aux métabolons

Présenté par :

Jean-Etienne BASSARD

Chargé de Recherche – Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS (UPR2357)

Equipe Evolution et diversité du métabolisme des plantes

Soutenance le 24 Mai 2019, devant le jury composé de :

Frédéric Bourgaud	DG-Recherche – Plant Advanced Technology SA – Nancy	Rapporteur
Denis Falconet	Chargé de Recherche (HDR) – CEA – Grenoble	Rapporteur
Philippe Huguency	Directeur de Recherche – INRA – Colmar	Rapporteur
Serge Antonczak	Professeur – Université Côte D’Azur – CNRS – Nice	Examineur
Anne-Catherine Schmit	Professeur – Université de Strasbourg – CNRS – Strasbourg	Examineur
Danièle Werck-Reichhart	Directeur de Recherche Emérite – CNRS– Strasbourg	Garant

Table des matières

Avant-propos.....	5
<i>Curriculum Vitae</i>	7
Formation initiale	7
Formations complémentaires	7
Expériences professionnelles	7
Collaborations et rayonnement	9
Responsabilités collectives	9
Responsabilités scientifiques	9
Production scientifique	9
Prix – distinctions – certifications.....	12
Introduction et positionnement de mes recherches	13
Compréhension moléculaire de la synthèse de métabolites spécialisés chez les plantes.....	15
Introduction.....	15
Le métabolisme spécialisé des plantes	15
La voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes	16
Les Cytochromes P450	17
Chapitre 1 : Du gène à sa fonction	19
Etude de la plasticité enzymatique de cytochromes P450 de la famille CYP76.....	19
Etude fonctionnelle des CYP98As et CYP73As chez <i>Nicotiana tabacum</i> et <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
Chapitre 2 : Des gènes à la voie de biosynthèse	30
Chapitre 3 : Des gènes aux métabolons	35
Introduction.....	35
Le métabolon de la lignine	36
Le métabolon de la dhurrine	44
Conclusion	49
Chapitre 4 : Rôle des métabolons dans la régulation et la plasticité du métabolisme végétal - Projet de recherche actuel et perspectives	50
Synopsis.....	50
Contexte et enjeux de mon projet	50
Le métabolon : définition et propriétés	50
Éléments en faveur de l'existence des métabolons et questions en suspens	51
Comment aller plus loin ?.....	52
Description du projet	54

Conclusion et perspectives.....	59
Bibliographie	61
Trois publications les plus significatives.....	71

Remerciements

Tout d'abord je voudrais remercier les membres de mon jury pour avoir accepté de venir à Strasbourg. Merci au Pr. Frédéric Bourgaud au Dr. Denis Falconet et au Dr. Philippe Huguéney d'avoir accepté d'être les rapporteurs et d'avoir donc porté un œil critique sur mon travail. Merci au Pr. Anne-Catherine Schmit et au Pr. Serge Antonczak, pour leur participation à ce jury. Et merci à Dr. Danièle Werck d'avoir accepté d'être ma garante pour cette HDR, et également pour m'avoir supporté depuis mon premier stage dans son équipe durant l'été 2004.

Je remercie également les nombreuses personnes (chercheurs, ingénieurs, techniciens, étudiants) des laboratoires d'accueil ou des laboratoires partenaires, qui m'ont accompagné depuis 2004 et mon premier stage à l'IBMP. La liste de toutes ces personnes devient de plus en plus longue, pour n'oublier personne, je tairai de ce fait leurs noms, mais je pense à eux. Je les remercie pour les échanges scientifiques et techniques, qui m'ont permis de progresser dans les différents projets de recherche. Mais aussi, je les remercie pour tous les échanges non-scientifiques.

Merci tout particulièrement au Dr. Pascaline Ullmann et au Dr. Franck Pinot pour la relecture critique du brouillon de ce manuscrit.

Enfin je tiens à remercier mon entourage proche sans qui je ne serais sans doute jamais arrivé jusque-là...

Merci à tous !

"La reconnaissance est la mémoire du cœur." Henri Lacordaire

Avant-propos

Quinze années se sont écoulées depuis mon premier stage dans un laboratoire de recherche durant l'été 2004. Au cours de ces années, mes différents travaux de recherche m'ont amené à mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en œuvre par les plantes pour produire des métabolites spécialisés, impliqués entre autres dans la défense ou la croissance des plantes et pour certains ayant également un fort intérêt économique (colorants, biopolymères, nutraceutiques, médicaments...).

Les aléas des financements et des résultats scientifiques ont fait que la plus grosse partie de mon travail de recherche fut consacrée à étudier les métabolons, un sujet passionnant et complexe. Un sujet que je poursuis actuellement suite à mon recrutement en tant que Chargé de Recherche à l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) de Strasbourg.

Mon tout premier stage réalisé à l'IBMP de Strasbourg, dans l'équipe de Danièle Werck, a été dédié à l'étude de la métabolisation de xénobiotiques par des cytochromes P450 (P450s). J'ai continué dans cette équipe par un stage de Master 2 en essayant d'améliorer l'expression et la purification d'enzymes de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Ceci fut le préambule de mon projet de thèse financé par une bourse MENRT et réalisé dans l'équipe de Danièle Werck. Durant cette thèse, j'ai cherché à comprendre comment se forme un métabolon (complexe enzymatique) constitué par les enzymes préalablement étudiées lors de mon stage de Master 2. Durant cette thèse j'ai également initié un projet consistant à analyser les fonctions de P450s des familles CYP73 et CYP98. J'ai poursuivi ces projets lors d'un court postdoctorat dans l'équipe de Danièle Werck. Cette première période de mon parcours scientifique a été déterminante pour la suite de mes activités de recherche. C'est au cours de cette période que j'ai acquis la maîtrise de nombreuses techniques de biologie moléculaire et cellulaire, et de microscopie. Outre ces considérations techniques, c'est également au cours de cette période que j'ai appris à gérer un projet scientifique. J'ai ensuite choisi de poursuivre mes travaux dans le groupe de Birger Møller à l'Université de Copenhague au Danemark. En tant que postdoctorant, puis assistant professeur, j'ai étudié la formation du métabolon de la dhurrine, une molécule de la classe des glucosides cyanogéniques. J'ai également participé à l'étude d'interactions protéine-protéine impliquées dans la formation de métabolons de différentes voies de biosynthèse. Et j'ai finalement participé à la prédiction et l'élucidation de voies de biosynthèse phénoliques de différentes baies. Pour des raisons institutionnelles, mon dernier contrat à l'Université de Copenhague n'a pas été reconduit fin 2016. Plutôt que de rechercher immédiatement un nouveau contrat postdoctoral, j'ai choisi de mettre à profit cette période de transition pour 1) valoriser un certain nombre de mes travaux (7 articles publiés et des présentations orales à 2 conférences et 1 séminaire sur invitation), et 2) construire un projet avec l'IBMP afin de donner une nouvelle dimension à mes travaux dans un contexte original et renouvelé, tout en y intégrant les derniers développements technologiques.

Après une introduction non-exhaustive sur les thèmes principaux de mes travaux précédents, à savoir, le métabolisme spécialisé, la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes et les P450s, j'aborderai dans un premier chapitre la compréhension moléculaire de la synthèse de métabolites spécialisés chez les plantes : du gène à sa fonction. J'expliquerai comment j'ai abordé l'étude de la plasticité enzymatique de P450s et je montrerai également comment j'ai étudié les fonctions de deux familles de P450s (CYP98 et CYP73) chez *Nicotiana tabacum* et *Arabidopsis thaliana*. Dans un second chapitre j'aborderai la compréhension de la synthèse de métabolites spécialisés, des gènes à la voie de biosynthèse. Dans ce chapitre j'expliquerai comment différentes voies de biosynthèse phénoliques ont été prédites. Le troisième chapitre se concentrera sur la compréhension de l'organisation supramoléculaire des enzymes, dans le temps et l'espace cellulaire, et ainsi, la formation de métabolons. Enfin, au cours du quatrième chapitre de ce dossier, je montrerai que les différentes

étapes de ma carrière scientifique m'ont été utiles pour développer ma stratégie de recherche actuellement mise en œuvre au laboratoire.

Afin de rédiger ce manuscrit, j'ai fait appel à certains de mes résultats publiés et non publiés, qui ne sont pas présentés par ordre chronologique. La plupart de ces résultats sont le reflet d'un travail d'équipe, de nombreuses personnes y ont été associées.

Curriculum Vitae

Formation initiale

- 2010: Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie, Biologie Végétale.** Soutenue le 13 Décembre 2010 à l'Université de Strasbourg (France).
- 2006: Master 2 en Science de la Vie, spécialité Sciences du Végétal.** Université Louis Pasteur de Strasbourg (France), **Mention Bien, second de promotion.**
- 2005: Master 1 en Biologie Cellulaire et Physiologie, spécialité Sciences et Techniques du Végétal.** Université de Bourgogne, Dijon (France), **Mention Bien, major de promotion.**
- 2004: Licence en Biologie Cellulaire et Physiologie.** Université de Bourgogne, Dijon (France).
- 2003: Diplôme d'Etudes Universitaires Générales en Biologie.** Université de Franche-Comté, Besançon (France).

Formations complémentaires

- 2018: Data Science specialization.** Johns Hopkins University (sur Coursera).
- 2014: ABC de la gestion de projet.** Centrale Lille (France).

Expériences professionnelles

Recherche

- 2017:** Valorisation de mes travaux de Copenhague par la rédaction de 7 articles publiés. Présentation orale de mes travaux à 2 conférences. Participation à la rédaction de 2 rapports pour la Conseil Européen de la Recherche en lien au projet EU-FP7 BachBERRY.
- 2012-2016: Post-doctorat puis Professeur Assistant** – PLANT BIOCHEMISTRY LABORATORY, Université de Copenhague (Danemark).
Sujets : Etude de l'assemblage de complexes enzymatiques - Elucidation de voies de biosynthèse phénoliques.
Financé par le projet Européen FP7 BachBERRY (579K€), la fondation Villum pour le projet « Plant Plasticity » (7.2M€) et le programme d'excellence de l'Université de Copenhague « UNIK center for Synthetic biology » (16.14M€).
- 2011-2012: Post-doctorat** – INSTITUT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE DES PLANTES du CNRS de Strasbourg.
Sujet : Analyse fonctionnelle des CYP98As et CYP73As chez *Nicotiana tabacum*.
- 2006-2010: Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie, Biologie Végétale** – INSTITUT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE DES PLANTES du CNRS de Strasbourg.
Sujet : Etude des interactions protéine-protéine et protéine-membrane dans la voie des phénylpropanoïdes chez *A. thaliana*, mettant en jeu des P450s des familles CYP73 et CYP98.
Directeur de thèse : Dr. Danièle Werck-Reichhart.
Thèse financée par une **bourse MENRT** du Ministère de la Recherche et par Human Frontier Science Program Project.
- 2006: Stage** (7 mois) à l'INSTITUT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE DES PLANTES du CNRS de Strasbourg.
Sujet : Optimisation de l'expression et de la purification d'enzymes de la voie des phénylpropanoïdes.
- 2005: Stage** (4 mois) à l'INSTITUT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE DES PLANTES du CNRS de Strasbourg.
Sujet : Etude de Cytochromes P450 métabolisant des xénobiotiques.

Management

- **2014-2016: Membre du comité de pilotage du projet Européen BacHBerry**, qui regroupait 12 équipes académiques et 6 entreprises avec un budget total de 9.5M€.
- **2013-2016: Co-investigateur principal** et ayant participé à la **rédaction du projet** « Plant Plasticity », financé par la Fondation Villum à hauteur de 7.2M€.
- **2010: Participation à la rédaction du projet** « Phenowall » qui fut financé par l'ANR.

Enseignement

- **2016: Cours pratique et travaux dirigés d'enzymologie (10h)** en Licence, Université de Copenhague.
- **2015: Cours de génomique et biotechnologies végétales (4h)** en Master, Université de Copenhague.

Encadrement et co-encadrement

Licence, Master 1

- 2018-2019: Xeniya KIM et Marine SIRE**, Master UE VégéLAB (semestre 1 à 3 du Master) à l'Université de Strasbourg, 14 mois.
- 2012: Angela HORDUM VALENTE et Henrik MUNK FRISENVANG**, Licence 3 à l'Université de Copenhague, 1 mois en co-encadrement à 50%.
- 2011: Céline CONAN**, Master 1 à l'Université de Strasbourg, 4 mois.
- 2011: Noémie LALUNG**, Licence 3 à l'Université de Poitiers, 2 mois.
- 2008: Rodolphe VANWEDDINGEN**, Master 1 à l'Université de Strasbourg, 3 mois.

Master 2

- 2008-2009: Claire PARAGE**, Master 2 à l'Université de Strasbourg, 10 mois en co-encadrement à 50%.

Thèse

- 2016: Roberto FERRO**, Université de Copenhague, en co-encadrement à 33%.
- 2013-2016: Krutika BAVISHI**, Université de Copenhague, en co-encadrement à 25%.
- 2012-2013: Tomas LAURSEN**, Université de Copenhague, en co-encadrement à 33%.
- 2011-2014: Zhenhua LIU**, Université de Strasbourg, en co-encadrement à 33%.

Formation d'étudiants

Formation de 2 étudiants en Doctorat (Aldo ALMEIDA, Anna HOLZWARTH) et 4 étudiants en Master (Cecilie CETTI HANSEN, Jakob MOE LANGE, Josephine SCHRØDER, Jacob STEGLICH-ANDERSEN) pour la production de protéines recombinantes, la microscopie confocale et FLIM, ou l'élucidation de voies de biosynthèse.

Vulgarisation scientifique

2015-2016: Un cours avec des travaux pratiques de 3h pour des élèves de 1^{ière} et Terminal S du lycée Français de Copenhague. L'objectif était de sensibiliser les élèves aux Sciences du végétal, la Biologie Synthétique et aux activités du laboratoire.

2010-2011: Des travaux pratiques de 4h pour des élèves de 1^{ière} S du lycée St-Etienne à Strasbourg. Sensibilisation des élèves aux Sciences du végétal et au monde de la recherche, plus particulièrement sur le métabolisme spécialisé des plantes.

Collaborations et rayonnement

Au niveau national

- L'**Université de Strasbourg**. UMR7213, équipe « Biophotonique des interactions moléculaires et cellulaires » (L. Richert, Pr. Y. Mély).
- L'**Université Claude Bernard de Lyon**. INRIA, « Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive » (M.F. SAGOT).

Au niveau international

- L'**Université de Copenhague**. Equipe « Plant Molecular Biology » (Pr. B. Halkier), équipe « Plant Biochemistry » (Pr. S. Bak, Pr. B.L. Møller, T. Laursen).
- L'**Université de Singapour**. Equipe « Singapore lipidomics incubator » (Pr. M. Wenk, F. Torta).
- L'**Université de Birmingham**. Equipe « Structural Biology and Molecular Biophysics » (Sir Pr. T. Dafforn).
- **John Innes Centre**. Equipe « Metabolic Biology » (Pr. C. MARTIN, P. URBAN)
- **Société EVOLVA** (M. NAESBY).
- L'**Université de Lisbonne**. Instituto Superior Técnico, « Dept. of Computer Science and Engineering » (Ass. Pr. S. VINGA, A. VERISSIMO).
- L'**Université d'état du Michigan**. Département « Biochemistry and Molecular Biology » (Ass. Pr. B. HAMBERGER).

Responsabilités collectives

- Responsable du suivi de divers appareillages ((ultra-)centrifugeuses, lecteur microplaque, pH mètre, microscopes) et de la formation des personnels pour leur utilisation.
- **2009:** Membre de la commission « pitidej » de l'ADDAL (Association des Docteurs et Doctorants d'Alsace) pour la rencontre Doctorants et Docteurs en poste dans le secteur privé.

Responsabilités scientifiques

- Rapporteur pour des journaux à comité de lecture : *Planta*, *Nature Communication*.
- **2018:** Président d'une session pour le workshop Multifunctional Agriculture - Management and Utilization of Bioresources à Yangling en Chine.

Production scientifique

Articles originaux dans des revues internationales

- [10] *Co-expression of squalene epoxidases with triterpene cyclases boosts production of triterpenoids in plants and yeast.* (2018) L Dong, J Pollier, **J-E Bassard**, G Ntallas, A Almeida, E

- Lazaridi, B Khakimov, P Arendt, LS de Oliveira, F Lota, A Goossens, F Michoux, S Bak. **Metabolic Engineering**. 49: 1-12. (IF 7.674, 3 citations).
- [9] *A single oxidosqualene cyclase from *Ononis spinosa* produces the seco-triterpenoid α -onocerin and demonstrates convergent evolution of α -onocerin pathways in plants.* (2018) A Almeida, L Dong, B Khakimov, **J-E Bassard**, T Moses, F Lota, A Goossens, G Appendino, S Bak. **Plant physiology**. 176: 1469-1484. (IF 5.949, 2 citations).
 - [8] *BachBerry: BACterial Hosts for production of Bioactive phenolics from bERRY fruits.* (2018) BachBERRY consortium. **Phytochemistry reviews**. 17: 291-326. (IF 3.875, 9 citations).
 - [7] *MassBlast: A workflow to accelerate RAN-seq and DNA database analysis.* (2017) A Veríssimo*, **J-E Bassard***, A Julien-Laferrrière, M-F Sagot, S Vinga. **bioRxiv** doi: 10.1101/131953 *co-premiers auteurs (1 citation).
 - [6] *Characterization of a dynamic metabolon producing the defense compound dhurrin in sorghum.* (2016) T Laursen, J Borch, C Knudsen, K Bavishi, F Torta, HJ Martens, D Silvestro, NS Hatzakis, MR Wenk, TR Dafforn, CE Olsen, MS Motawia, BR Hamberger, BL Møller*, **J-E Bassard***. **Science**. 354: 890-893. (IF 41.058, 76 citations) *auteurs correspondants.
 - [5] *In vivo assembly of DNA-fragments in the moss, *Physcomitrella patens*.* (2016) BC King, K Vavitsas, NK Ikram, J Schrøder, LB Scharff, **J-E Bassard**, BR Hamberger, PE Jensen, HT Simonsen. **Scientific Reports**. 6: 25030. (IF 4.122, 15 citations).
 - [4] *CYP76C1-mediated linalool metabolism and formation of volatile and soluble linalool oxides in *Arabidopsis* flowers, a strategy for defense against floral antagonists.* (2015) B Boachon, RR Junker, L Miesch, **J-E Bassard**, R Hoefler, R Caillieaudeau, DE Seidel, A Lesot, C Heinrich, J-F Ginglinger, L Allouche, B Vincent, DSC Wahyuni, C Paetz, F Beran, M Miesch, B Schneider, K Leiss, D Werck-Reichhart. **Plant Cell**. 27(10): 2972-2990. (IF 8.228, 33 citations).
 - [3] *A novel method for monitoring localization of cytochromes P450 and other ER membrane associated proteins: a tool for investigating the formation of metabolons.* (2012) **J-E Bassard**, J Mutterer, F Duval, D Werck-Reichhart. **FEBS journal**. 279(9): 1576-1584. (IF 4.530, 30 citations).
 - [2] *Protein-protein and protein-membrane associations in the lignin pathway from *Arabidopsis thaliana*.* (2012) **J-E Bassard**, L Richert, J Geerinck, H Renault, F Duval, P Ullmann, M Schmitt, E Meyer, J Mutterer, W Boerjan, G De Jaeger, Y Mely, A Goossens and D Werck-Reichhart. **Plant Cell**. 24(11): 4465-4482. (IF 8.228, 86 citations).
 - [1] *Evolution of a novel phenolic pathway for pollen development.* (2009) M Matsuno, V Compagnon, G Schoch, M Schmitt, D Debayle, **J-E Bassard**, B Pollet, A Hehn, D Heintz, P Ullmann, C Lapierre, F Bernier, J Ehlting, D Werck-Reichhart. **Science**. 325(5948): 1688 - 1692. (IF 41.058, 117 citations).
- Articles de revue*
- [5] *How to prove the existence of metabolons?* (2018) **J-E Bassard***, BA Halkier. **Phytochemistry reviews**. 17: 211-227. (IF 3.875, 5 citations) *auteur correspondant.
 - [4] *Assembly of dynamic P450-mediated metabolons – order versus chaos.* (2017) **J-E Bassard**, BL Møller, T Laursen. **Current Molecular Biology Reports**. 3: 37-51 (IF 1.889, 24 citations).
 - [3] *Plasticity of specialized metabolism as mediated by dynamic metabolons.* (2015) T Laursen, BL Møller, **J-E Bassard**. **Trends in Plant Science**. 20(1): 20-32. (IF 12.149, 54 citations).
 - [2] *Cytochrome P450-mediated metabolic engineering: current progress and future challenges.* (2014) H Renault, **J-E Bassard**, BR Hamberger, D Werck-Reichhart. **Current Opinion in Plant Biology**. 19: 27-34. (IF 7.349, 84 citations).

- [1] *Phenolamides: bridging polyamines to the phenolic metabolism*. (2010) J-E Bassard, P Ullmann, F Bernier and D Werck-Reichhart. *Phytochemistry*. 71(16): 1808-1824. (IF 3.186, 147 citations).

Chapitres de livres

- [2] *Molecular snapshots of dynamic membrane-bound metabolons*. (2019) J-E Bassard* and Tomas Laursen*. *Methods in enzymology*. Volume Metabolons and Supramolecular Enzymes Assemblies, 617: 1-27. (IF 1.984, 0 citation) *auteurs correspondants.
- [1] *High throughput characterization of candidate terpenoid genes using transient expression in Nicotiana benthamiana leaves*. (2014) SS Bach, J-E Bassard, J Andersen-Ranberg, ME Møldrup, and BR Hamberger. *Methods in Molecular Biology*. Volume Plant Isoprenoids, 1153:245-255. (IF 1.29, 24 citations).

H-index 11, 710 citations, IF moyen 9.78 le 07 Mars 2019.

Communications par posters lors de congrès nationaux ou internationaux

- **2013**: *Specialized diterpene metabolism and related enzyme's organization*. I Pateraki, J Andersen-Ranberg, J-E Bassard, B Hamberger. Plant Biotech Denmark. Copenhagen. Denmark.
- **2009**: *Investigations on protein-membrane and protein-protein associations in the formation of metabolon in phenylpropanoids metabolism*. J-E Bassard, J Borsh, H Duan, FD Duval, P Roepstorff, S Sligar, D Werck-Reichhart. 8th Plant GEM meeting. Lisbonne. Portugal.
- **2009**: *Investigations on protein-membrane and protein-protein associations in the formation of metabolon in phenylpropanoids metabolism using confocal microscopy and BIA-anchored lipid nanodiscs*. J-E Bassard, FD Duval, J Borsh, H Duan, P Roepstorff, S Sligar, D Werck-Reichhart. 8^{ième} Colloque national de la Société Française de Biologie Végétale. Strasbourg. France. **Prix du meilleur poster présenté.**
- **2008**: *Investigations on protein-membrane and protein-protein associations in the formation of metabolon in plant secondary metabolism using confocal microscopy and BIA-anchored nanodiscs*. FD Duval*, J-E Bassard*, J Borsh, H Duan, P Roepstorff, S Sligar, D Werck-Reichhart. 9th International symposium on Cytochromes P450 biodiversity and biotechnology. Nice. France.
- **2008**: *Investigations on protein-membrane and protein-protein associations in the formation of metabolon in plant secondary metabolism using LSCM and BIA-anchored NANODiscs*. J-E Bassard, FD Duval, J Borsh, H Duan, P Roepstorff, S Sligar, D Werck-Reichhart. FEBS Advanced course: cytochromes P450 System. Kranjska-Gora. Slovenie.

Communications orales lors de congrès nationaux ou internationaux

- **2018**: *Metabolons and their impact on biomolecules production*. Multifunctional Agriculture - Management and Utilization of Bioresources. Yangling. Chine (**Invité**).
- **2017**: *The dhurrin pathway - An example of P450-mediated metabolism organized in metabolon*. 7^{ième} colloque Méta-SP. Strasbourg. France. (**Invité**).
- **2017**: *P450-mediated metabolism organized as metabolon - Example of the dhurrin metabolon*. Synthetic Biology for natural products conference. Cancun. Mexique. (**Invité**).

- **2016:** *Biosynthetic pathway identification of selected berry phenolics and development of bioinformatics tools for pathway discovery.* The XXVIIIth International Conference on Polyphenols. Vienne. Autriche. (**Invité à une conférence satellite**).
- **2016:** *P450-mediated metabolism organized as metabolons – The return in grace of an old concept?* 13th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology. Vancouver. Canada. (**Invité**).
- **2011:** *Investigations on protein-membrane and protein-protein interactions upstream of the phenylpropanoid pathway in Arabidopsis thaliana.* 1st Working on Walls meeting. Vancouver. Canada.

Communications orales sous la forme de séminaires sur invitation

- **2017:** *The overlooked facet of the plant metabolism complexity.* INRA. Nancy. France.
- **2013:** *Enzymes organization in plant metabolon.* CEA. Cadarache. France.
- **2013:** *Proteins organization in plant metabolon.* NanoScience Center. Copenhague. Danemark.
- **2012:** *Protein-membrane and protein-protein associations in the upstream part of the phenylpropanoid pathway in A. thaliana.* Université de Copenhague. Frederiksberg C. Danemark.

Prix – distinctions – certifications

- **2019:** Certification Project Management Professional (PMP™) du Project Management Institute.
- **2016:** Recommandation dans F1000Prime de l'article: *Characterization of a dynamic metabolon producing the defense compound dhurrin in sorghum.* (2016) T Laursen, [...], **J-E Bassard***. *Science*. 354: 890-893. *auteur correspondant.
- **2009:** Meilleur poster présenté au 8^{ième} Colloque national de la Société Française de Biologie Végétale.
- **2006:** Bourse MENRT du Ministère de l'Education Supérieure et de la Recherche ayant financé mon doctorat.

Introduction et positionnement de mes recherches

Tout être vivant est confronté en permanence à des situations de stress auxquelles il doit s'adapter pour survivre. Les animaux sont en mesure de se battre ou de se déplacer pour affronter ou fuir un danger. En revanche, les plantes du fait de leur sédentarité, semblent à première vue très vulnérables et dépourvues face à ces situations de stress (Figure 1). Mais ce n'est pas le cas, en effet, au cours de l'évolution les végétaux ont su développer tout un panel de stratégies leur permettant de tirer profit de leur environnement et de s'adapter à un grand nombre de contraintes. La mise en place de ces stratégies a été plus ou moins rapide suivant leur nécessité.

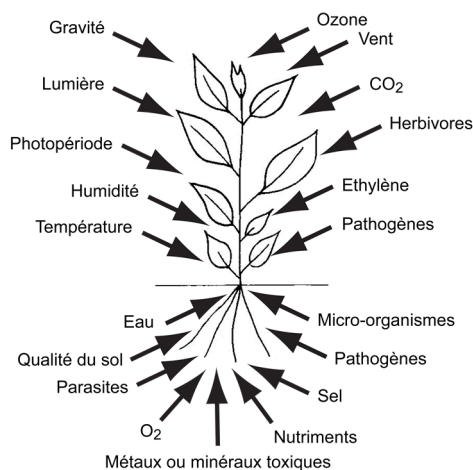


Figure 1. Stress environnementaux pouvant impacter la croissance et le développement de la plante

Par exemple, les plantes sont parfois en mesure de s'adapter très rapidement à l'apparition de xénobiotiques dans le milieu environnant. En effet, dans certains cas, ces molécules étrangères peuvent devenir la cible d'enzymes préexistantes (comme les cytochromes P450s ou les glycosyltransférases) capables de les modifier pour les inactiver ou les activer. Cette propriété fortuite est à l'origine de la résistance de certaines plantes aux herbicides.

La plus commune des stratégies de survie consiste en la biosynthèse de la lignine conférant aux plantes la possibilité de transporter l'eau, de résister à la dessiccation, tout en leur donnant une rigidité permettant un port érigé pour gagner la compétition pour capter la lumière et réaliser la photosynthèse, et ainsi, pour vivre.

Un autre exemple d'adaptation des plantes, est le détournement de processus généraux, pour produire à partir de précurseurs universels (du métabolisme primaire), un arsenal de molécules extrêmement diversifié et adapté, leur permettant de réagir à une multitude de situations. Ce métabolisme dit « spécialisé », autrefois appelé péjorativement « secondaire », est d'une complexité sans égale dans la nature. Il résulte de phénomènes de duplications géniques associées à l'apparition de mutations qui entraînent des modifications de spécificité de substrat et de type de réactions enzymatiques.

Ce métabolisme spécialisé, extrêmement variable d'une plante à l'autre, permet par exemple la production constitutive de molécules dans certains organes. C'est le cas de la lignine. En dehors de ces molécules produites constitutivement, il existe des molécules dont la synthèse se fait en réponse à des stimulations diverses et variées, comme par exemple une agression par un herbivore. Dans ce cas, leur synthèse peut être induite et régulée de manière spatio-temporelle précise.

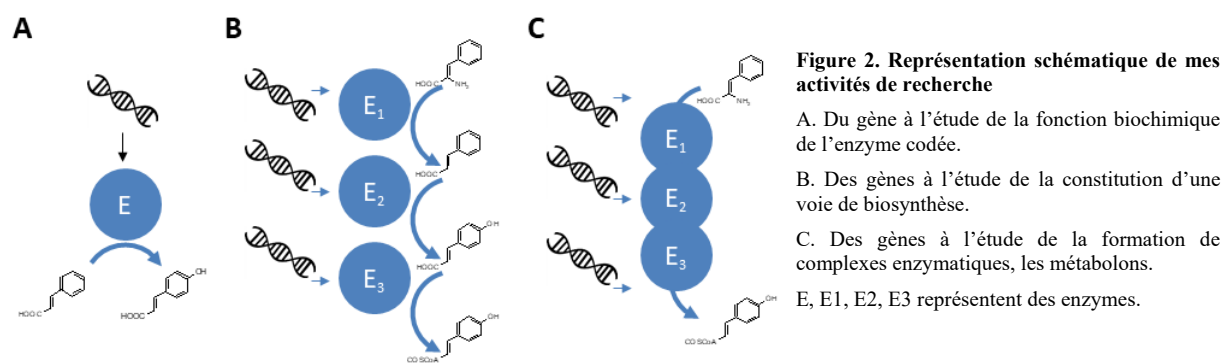
Si les molécules issues du métabolisme spécialisé représentent des adaptations évolutives des plantes à leur environnement, cette grande diversité de molécules, en plus d'être vitale pour les plantes, est également largement exploitée par l'Homme depuis des millénaires, en tant que substances actives de médicaments, nutraceutiques, cosmétiques, colorants ou produits phytosanitaires. Le réservoir de molécules qui reste à explorer est immense. La compréhension de la biosynthèse de ces molécules passe par le décryptage du métabolisme spécialisé de ces plantes. Les biotechnologies et la biologie synthétique, quant à elles, permettent de produire ces molécules, soit dans des systèmes hétérologues (comme cela est déjà le cas pour certaines molécules), soit dans les plantes elles-mêmes (ce qui est actuellement encore rare).

L'existence même des métabolites spécialisés au sein des plantes suscite un grand nombre de questions. S'ils peuvent maintenant être caractérisés grâce aux méthodes analytiques modernes, les

mécanismes mis en jeu pour leur biosynthèse restent souvent méconnus, mais fondamentaux à comprendre. Ces molécules, parfois de structures extrêmement complexes, sont produites grâce à des cascades enzymatiques sous contrôle de facteurs génétiques et environnementaux. La connaissance des fonctions de ces enzymes et la compréhension des mécanismes sous-jacents à leur organisation représentent encore une boîte noire qu'il est important d'ouvrir. En effet, les ressources investies dans la biosynthèse de ces molécules impactent de manière significative la croissance et le développement des plantes et *in fine* leur qualité ou leur rendement agronomique, mais aussi la capacité des plantes à résister à leur environnement ou à produire des molécules d'intérêt pour l'Homme.

Actuellement, la compréhension du métabolisme spécialisé d'une plante donnée, dans sa globalité, reste encore un objectif disproportionné. Il est nécessaire pour aborder l'étude du métabolisme spécialisé de se restreindre à quelques exemples précis. Dans le cadre de mes activités de recherche, **j'ai cherché et je cherche encore à comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la biosynthèse de métabolites spécialisés et impliquant notamment des cytochromes P450**. Cette famille de gènes impliquée dans un grand nombre de voies de biosynthèse de molécules d'intérêt semble jouer un rôle très important dans le métabolisme spécialisé en réalisant des réactions biochimiques complexes et souvent limitantes.

Durant mes activités de recherche, je me suis ainsi attaché à l'étude de quelques chaînons élémentaires (les enzymes, Figure 2A), et j'ai poursuivi par la caractérisation (Figure 2B) et l'étude de l'organisation de voies de biosynthèse dans une cellule (Figure 2C).



Une accumulation de travaux indépendants, incluant mes recherches passées, semble indiquer que dans un contexte en évolution les voies de biosynthèse s'organisent en complexes protéiques dynamiques, également appelés métabolons. C'est ce point que je continue à explorer plus en détail avec mon **projet de Chargé de Recherche centré sur l'étude de la formation dynamique de métabolons chez les plantes**.

"On passe la moitié de sa vie à retenir sans comprendre, et l'autre moitié à comprendre sans retenir."
Antoine de Rivarol

Compréhension moléculaire de la synthèse de métabolites spécialisés chez les plantes

Dans le cadre de mes activités de recherche certains thèmes furent récurrents, comme l'étude du métabolisme spécialisé, de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, et de cytochromes P450. Je vais donc introduire brièvement ces thèmes.

Introduction

Le métabolisme spécialisé des plantes

Le métabolisme spécialisé des plantes, était encore appelé il y a quelques années « métabolisme secondaire », considérant que les métabolites secondaires ne participaient pas directement à la croissance, au développement ou à la reproduction de la plante, mais plutôt, participaient à la survie contre les stress biotiques et abiotiques. Au contraire, les métabolites primaires étaient considérés comme essentiels pour le développement de la plante et de la cellule, en étant présents chez toutes les espèces végétales. Avec l'avancée des connaissances, la frontière entre ces deux types de métabolisme est de plus en plus ténue. Ainsi, les métabolites secondaires sont maintenant appelés métabolites « spécialisés », car il y a de plus en plus de données montrant l'importance de ces métabolites pour le bon fonctionnement de la cellule et de la plante. De plus, les gènes codant pour des enzymes du métabolisme spécialisé ont été recrutés du métabolisme primaire par duplications géniques suivies de néofonctionnalisations durant l'évolution (Boudet, 2007).

Les métabolites spécialisés sont formés à partir de précurseurs universels, présents chez toutes les plantes. Par exemple, toutes les plantes synthétisent des phénylpropanoïdes à partir de phénylalanine. Cependant, certaines plantes ont subi des divergences évolutives, qui les ont conduites à produire soit de grandes quantités de certains de ces phénylpropanoïdes, soit à produire des structures chimiques uniques pour ces phénylpropanoïdes. Ainsi, toutes les classes de phénylpropanoïdes ne sont pas présentes chez toutes les espèces végétales.

Les plantes étant des organismes sessiles, pour s'adapter à leur environnement, elles ont évolué afin de synthétiser une très grande variété de molécules du métabolisme spécialisé. Ces molécules leur permettent de lutter contre les stress abiotiques et biotiques, mais aussi de se reproduire, de communiquer entre elles ou avec d'autres organismes. La diversité en métabolites spécialisés produits résulte d'une cascade de réactions réalisée par diverses familles d'enzymes telles que des ligases, des réductases, des oxygénases ou des transférases. Par ces processus, les plantes produisent plus de 200 000 métabolites connus, qui, d'après leurs voies de biosynthèse et leurs structures, peuvent être classés en trois principales familles : les terpénoïdes, les phénylpropanoïdes et les alcaloïdes. Les molécules de ces trois classes peuvent avoir des fonctions différentes dans la plante, et peuvent avoir des intérêts économiques très variés.

La biosynthèse des métabolites spécialisés est contrôlée de manière très précise. Pour remplir leur(s) fonction(s) et pour parfois limiter leur toxicité, l'accumulation des métabolites spécialisés est généralement compartimentée dans des tissus spécifiques, voir des cellules spécifiques, dans lesquelles leur localisation subcellulaire est également finement contrôlée. La majeure partie des recherches s'oriente vers l'identification de nouveaux gènes codant pour des enzymes ou des facteurs de transcription pour accroître ou diminuer la production de métabolites spécialisés spécifiques, pour des raisons économiques (Zhao et al., 2005). Seulement quelques recherches ont concerné la compréhension de l'organisation spatiale et temporelle des enzymes impliquées, ainsi que l'impact de cette organisation sur les rendements de production des métabolites. Ce point sera abordé ultérieurement dans ce rapport.

Mes activités de recherche se sont principalement déroulées autour de l'étude de la voie des phénylpropanoïdes.

La voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes

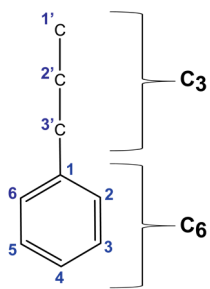


Figure 3. Structure principale des phénylpropanoïdes

Le métabolisme des phénylpropanoïdes est spécifique du règne végétal, et il est particulièrement important chez les plantes terrestres.

La voie du shikimate est le point d'entrée à la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, tous formés à partir de la phénylalanine. Ces phénylpropanoïdes ont donc leur structure de base en C6-C3 (Figure 3).

La voie des phénylpropanoïdes est organisée en (Figure 4) :

- Une voie centrale, qui démarre à la phénylalanine, transformée en *p*-coumaroyl-CoA,
- Un ensemble de branches conduisant à la formation de différentes sous-familles de molécules, comme les flavonoïdes, les stilbènes, les coumarines, les phénolamides, les sous-unités de biopolymères, etc.

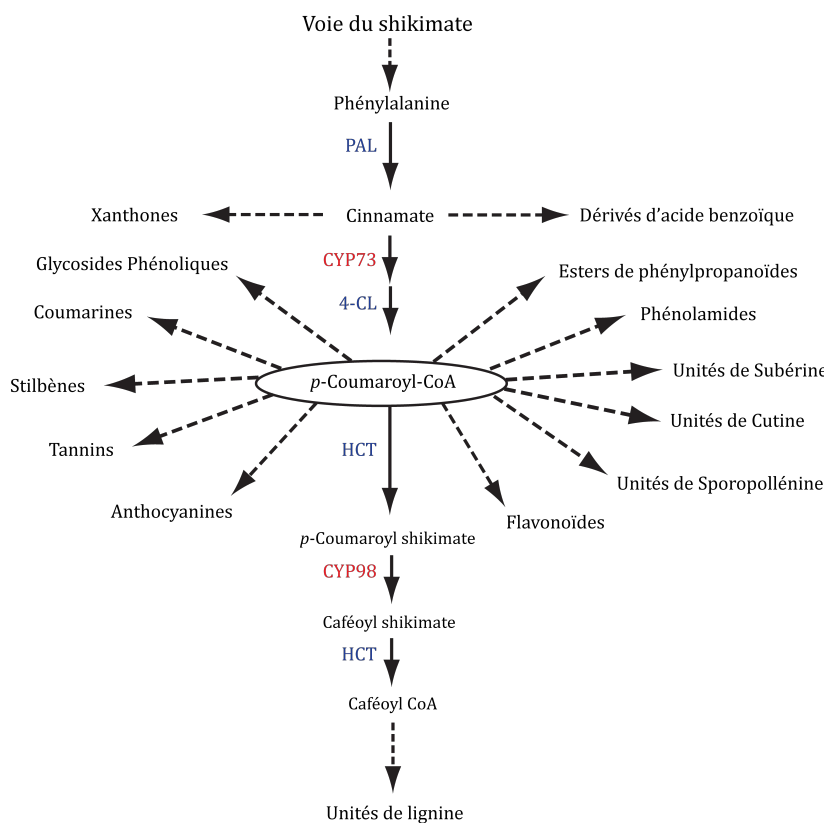


Figure 4. Représentation simplifiée du métabolisme des phénylpropanoïdes

PAL : Phénylalanine Ammonia Lyase ; 4CL : 4-Coumaroyl CoA Ligase ; HCT : HydroxycinnamoylCoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase. En bleu, certaines enzymes solubles cytosoliques. En rouge, certains P450s membranaires.

Ces molécules forment la famille de molécules la plus abondante de la biosphère. Les phénylpropanoïdes ont joué un rôle prépondérant dans l'adaptation des plantes au milieu terrestre. Ils ont un large panel de fonctions qui sont essentielles à la structure et au maintien de la plante, mais également, à sa défense, à son développement et à sa reproduction. La voie des phénylpropanoïdes canalise jusqu'à 40% du carbone fixé par les plantes vers la biosynthèse de la lignine, de la subérine, et d'une grande diversité de pigments, d'arômes, de molécules de défense, de puissants antioxydants, des molécules signal ou liées au développement et à la fertilité.

Les composés ainsi obtenus présentent le plus souvent un fort intérêt économique comme par exemples la lignine ou des médicaments, la podophyllotoxine (un anticancéreux produit par *Podophyllum peltatum*), l'eugénol (un composé antiseptique et analgésique local produit par *Syzygium aromaticum* ou *Capsicum spp.*).

De nombreuses données démontrent la contribution des phénylpropanoïdes aux performances agronomiques, industrielles, et nutritionnelles des ressources agraires (Vogt, 2010). De nombreuses études épidémiologiques mettent en évidence l'importance d'une alimentation riche en fruits et légumes pour réduire l'incidence de maladies, comme le cancer ou les maladies cardiovasculaires. Ces

effets préventifs sont attribuables, en partie, aux phénylpropanoïdes. Leurs effets protecteurs sont sans doute liés à leur activité antioxydante contre les radicaux libres, les ions superoxydes, *etc.* L'activité antioxydante la plus élevée fut enregistrée avec l'acide caféique (Chandrasekara and Shahidi, 2010). Les phénylpropanoïdes sont présents en grandes quantités dans le thé, le vin rouge, le café, le chocolat, par exemple.

Ainsi, une meilleure compréhension de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, est un préalable pour envisager de réaliser de l'ingénierie métabolique pour la synthèse de molécules d'intérêt de cette famille. Pour former la large diversité de phénylpropanoïdes, le squelette carboné subit, de manière régio-spécifique, de nombreuses hydroxylations, méthylations, glycosylations, acylations, prénylations, ... grâce à l'intervention de diverses familles d'enzymes, comme les méthyltransférases, les glycosyltransférases, les acyltransférases, et les cytochromes P450.

Les Cytochromes P450

Les cytochromes P450 (P450s) constituent l'une des plus importantes classes d'enzymes, en quantité de réactions biochimiques catalysées et en nombre d'isoformes. Ils ont été mis en évidence pour la première fois dans les années soixante à partir d'homogénats de foie de rat (Garfinkel, 1958; Klingenberg, 1958; Omura and Sato, 1964a, 1964b), étant alors considérés comme caractérisés par un pic d'absorption à 450 nm à l'état réduit et en présence de monoxyde de carbone. Il s'est avéré par la suite que les seules ressemblances entre les P450s sont d'avoir une structure tridimensionnelle commune, et d'être des hémoprotéines partageant une grande conservation de quelques motifs caractéristiques dans leur séquence protéique primaire :

- en N-terminal un motif riche en résidus basiques puis en proline (PPXP) qui favorise le repliement du domaine globulaire du P450 à la surface externe du Réticulum Endoplasmique (RE), en conférant de la flexibilité tout en stabilisant l'interaction avec la membrane,
- la partie centrale de l'hélice I qui contribue à l'activation de l'oxygène,
- une région située autour de la cystéine servant de site de liaison à l'hème en C-terminal (hélice L).

Chez les plantes, seuls, la cystéine servant à la fixation de l'hème et un domaine nommé triade E-R-R, servant à la stabilisation de la structure 3D des P450s, sont parfaitement conservés (Figure 5)(Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000; Werck-Reichhart et al., 2002; Nelson, 2004; Bak et al., 2011). En effet, de larges différences sont à noter dans la séquence primaire des P450s, avec certaines protéines partageant moins de 15% d'identité.

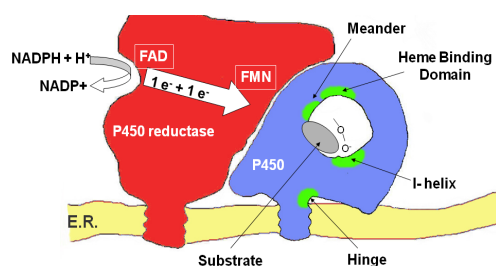


Figure 5. Fonctionnement catalytique du couple P450 oxydoréductase - P450

Le transfert de deux électrons du NADPH, essentiels à la réaction enzymatique, est dépendant de l'action de la P450 oxydoréductase. Figure tirée de Werck-Reichhart et al., 2000.

Les P450s eucaryotiques sont des enzymes membranaires, généralement localisés à la surface de la membrane du Réticulum Endoplasmique (RE). Ils sont associés aux membranes par une ancre hydrophobe en hélice α de 20-60 acides aminés en N-terminale de la séquence. Ce sont principalement des oxygénases, capables d'activer et de transférer un atome d'oxygène sur un substrat (généralement hydrophobe). Leur fonctionnement nécessite des électrons, le plus souvent transférés par l'intermédiaire d'une NADPH-cytochrome P450 oxydoréductase (POR), également membranaire et ancrée à la surface du RE (Figure 5)(Mansuy, 1998; Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000).

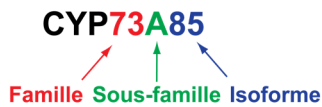


Figure 6. Nomenclature des P450s

La classification des P450s est principalement basée sur la similarité des séquences protéiques. Ils sont nommés « CYP » pour « Cytochrome P450 », suivis d'un nombre pour la famille, d'une (ou deux) lettre(s)

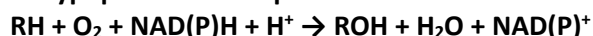
indiquant la sous-famille. Chaque sous famille peut être composée de nombreux gènes (isoformes), chacun identifié par un nombre (Figure 6). Les nombres et lettres sont assignés par ordre chronologique d'annotation. Dans ce système de classification, deux P450s partageant plus de 40% d'identité sont généralement de la même famille. Au-delà de 55% d'identité, ils font partis de la même sous-famille.

Les P450 animaux ont été les plus étudiés. Ils interviennent dans la biosynthèse ou le catabolisme de stéroïdes, leucotriènes, prostaglandines, acides biliaires, vitamine D... Ils participent aussi à la détoxification ou l'activation de molécules exogènes, *e.g.* plus de 75% des médicaments.

Si les P450s sont présents dans tous les règnes vivants, ils sont particulièrement diversifiés chez les végétaux, avec environ 1% du génome codant pour des P450s. La force conduisant à la diversification des P450s chez les plantes terrestres est fortement liée aux stratégies de survie. Leur diversification confère des avantages lors de la compétition avec d'autres organismes (Mizutani and Ohta, 2010). Les P450s interviennent dans de nombreux processus du métabolisme spécialisé et du métabolisme primaire, par exemple, la biosynthèse de métabolites spécialisés (phytoalexines, pigments, antioxydants...), d'hormones (auxines, gibbérellines, cytokinines, brassinostéroïdes...), de macromolécules structurales constituant de la paroi cellulaire ou des couches protectrices de surfaces (lignine, cutine, subérine...), la détoxification ou l'activation de nombreuses molécules exogènes (herbicides, polluants, insecticides...) (Sandermann, 1994; Werck-Reichhart et al., 2002).

Moins de 30% des P450s végétaux ont leur fonction physiologique caractérisée. Si l'on considère l'ensemble des espèces végétales, il existe des milliers de P450s qui semblent avoir, pour la plupart, des spécificités de substrat différentes. Ces spécificités de substrat reflètent les spécificités biochimiques de chaque espèce, et représentent un réservoir immense de réactions biochimiques. Actuellement, chez les végétaux, on connaît plus d'une centaine de réactions types catalysées par des P450s différents. Ce sont à la base, des oxygénations stéréo- et régio-spécifiques d'atomes non-activés (carbone, soufre, azote), qui peuvent se traduire par des hydroxylations, déalkylations, déshydratations, déshydrogénations, isomérisations, dimérisations, réductions, *etc.* (Mansuy, 1998; Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000; Bernhardt, 2006). Cette liste n'est pas exhaustive.

La réaction typique d'un P450 peut se résumer ainsi :



Les réactions catalysées par les P450s sont souvent difficiles à réaliser en chimie de synthèse. Les industries agronomiques et pharmacologiques peuvent utiliser ce panel de réactions biochimiques dans de nombreuses applications (Morant et al., 2003). Les P450s sont également souvent limitants dans une voie de biosynthèse, ce qui les rend importants en ingénierie métabolique et pour des applications biotechnologiques (Bernhardt, 2006). Ils peuvent être par exemple utilisés pour produire des molécules pour la parfumerie (Zhan et al., 2014) ou pour la production de médicaments, comme les précurseurs du taxol (utilisé dans des thérapies contre le cancer du sein, Ajikumar et al., 2010), de l'hydrocortisone (anti-inflammatoire, Szczebara et al., 2003) ou de l'artémisinine (antipaludique, Paddon et al., 2013). De forts intérêts économiques sont donc liés aux P450s.

Chapitre 1 : Du gène à sa fonction

Les analyses génomiques réalisées sur un grand nombre d'organismes vivants ont révélé que les gènes codant pour des enzymes de la famille des P450s sont significativement plus nombreux chez les plantes (Nelson, 2018). Des travaux réalisés au cours de ces 20 dernières années ont montré que ces enzymes sont impliquées dans toutes les voies de biosynthèse des plantes et sont un des éléments clés de leur adaptation à leur environnement (Mizutani and Ohta, 2010; Bak et al., 2011). L'analyse fine des génomes indique que certaines sous-familles de gènes sont représentées par plusieurs copies dans le génome, copies qui peuvent différer de seulement quelques nucléotides. Ces sous-familles sont celles qui contribuent le plus efficacement à la plasticité génétique des plantes en leur permettant de répondre rapidement à des contraintes environnementales spécifiques.

Etude de la plasticité enzymatique de cytochromes P450 de la famille CYP76

Introduction

Les P450s jouent un rôle important dans la détoxification de molécules organiques exogènes, comme les polluants et les médicaments. Les P450s augmentent la polarité de leurs substrats, et permettent ainsi leur élimination de la cellule (Goldstein and Faletto, 1993) ou leur stockage dans la vacuole ou la paroi.

Pour tester la plasticité enzymatique de ces enzymes, durant mon stage de Master 1, je me suis intéressé à la famille CYP76C chez *A. thaliana*. Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire dans les années 90 avaient montré le rôle déterminant de CYP76s dans la détoxification d'herbicides, en particulier ceux de la classe des phénylurées. Un P450, chimiquement inductible, isolé d'*Helianthus tuberosus* (CYP76B1), s'était révélé particulièrement efficace pour la conversion de phénylurées en composés non-phytotoxiques (Robineau et al., 1998). Une surexpression du gène *CYP76B1* dans le tabac ou dans *Arabidopsis* conféra aux transformants une tolérance accrue à deux phénylurées (Didierjean et al., 2002) et à un autre herbicide, le propanil. La famille des CYP76s semble donc être fortement impliquée dans le catabolisme des herbicides chez les plantes.

La famille *CYP76* chez *A. thaliana* compte neuf gènes, dont huit appartenant à la sous-famille *CYP76C* et un à la sous-famille *CYP76G*. Le rôle et l'expression des gènes de la famille *CYP76* n'était pas encore connus au commencement de mes travaux.

L'objectif de mon projet était **d'étudier la famille CYP76 potentiellement impliquée dans la détoxification de xénobiotiques chez *A. thaliana*** (plus particulièrement *CYP76C4* et *CYP76C5*).

Travaux réalisés

Afin d'évaluer la capacité des CYP76Cs à métaboliser divers xénobiotiques, j'ai réalisé un criblage fonctionnel d'herbicides et de quelques molécules modèles, proches des substrats physiologiques supposés.

J'ai produit les P450s à partir d'un système d'expression hétérologue (levure), pour ensuite préparer des microsomes (préparation membranaire enrichie en membrane du Réticulum Endoplasmique). Les molécules cibles ont été incubées avec les microsomes préparés à partir de souches de levures surexprimant chacun des P450s, ainsi qu'une POR d'*A. thaliana* dont le gène est inséré de façon stable au niveau du chromosome. L'expression des P450s et celle de la POR sont contrôlées par un promoteur inductible par le galactose : *GAL10-CYC1*. La métabolisation des molécules cibles fut suivie par l'analyse des métabolites grâce à un système de Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) couplé à un détecteur à barrette diodes. J'ai étudié la métabolisation de neuf molécules représentatives de différentes familles d'herbicides et de substrats physiologiques potentiels, intermédiaires du métabolisme spécialisé.

Ce travail a montré que la famille CYP76C semble contribuer de façon significative à la métabolisation des herbicides chez *A. thaliana* (Tableau 1). Cette métabolisation paraissait limitée principalement aux phénylurées. Mais les résultats indiquaient une différence de spécificité de substrat entre les différents membres de la famille CYP76 : CYP76C5 ne métabolisait aucune des molécules cibles, alors que, CYP76C1, CYP76C4 et le témoin CYP76B1 métabolisaient efficacement les phénylurées. De plus, les métabolites produits à partir du chlortoluron par CYP76B1 d'*H. tuberosus* et par les CYP76C d'*A. thaliana* n'étaient pas les mêmes, d'après leurs spectres UV et leurs temps de rétention, comparés à des molécules standards. La métabolisation par CYP76B1 se traduit par une attaque du chlortoluron au niveau de l'urée. Les CYP76Cs hydroxylent principalement au niveau du cycle aromatique. L'orientation du substrat dans le site actif est donc inversée.

C'était en outre la première fois que la métabolisation d'atrazine ou de propanil (herbicides n'appartenant pas à la famille des phénylurées) par un P450 de plante a pu être détectée.

Type de molécule	Molécules	Vide	CYP76C1	CYP76C2	CYP76C4	CYP76C5	CYP76B1	CYP76B8
Triazine	Atrazine			ND	5%±0,8			
Auxinique	Dicamba			ND				
Autres herbicides	Propanil		9%±2	ND				
	Bentazon			ND				
Phénylurées	Chlortoluron		9%±2	ND	34%±7		45%±10	
	Isoproturon		16%±5	ND	20%±17		1%±0,9	
Substrats métabolisme spécialisé	Coumarine							
	7-Ethoxycoumarine		3%±0,3	39%±13	11%±3		1%±0,3	
	7-Méthoxycoumarine		2%±0,0	3%±0,0	6%±0,5			

Tableau 1. Récapitulatif des résultats de métabolisation de xénobiotiques par des CYP76

Les molécules testées sont incubées avec des microsomes de levure exprimant les CYP76s (5 nmole de P450) durant 45 min à 27°C sous agitation. Les cases rouges indiquent un catabolisme important du substrat. Les cases orange, une faible métabolisation. Les cases grises, pas de métabolisation. ND, non déterminé. XX%±y : pourcentage moyen de métabolisation avec l'écart-type. Les résultats mentionnés sont la moyenne de 4 à 8 réactions indépendantes. CYP76C1, CYP76C2, CYP76C4 et CYP76C5 sont issus d'*A. thaliana*, CYP76B1 d'*H. tuberosus* (utilisé comme référence positive) et CYP76B8 d'*Ami majus L.*

Il a été montré que des P450s végétaux, de fonction physiologique connue, peuvent métaboliser des molécules exogènes dont la taille et la structure sont voisines de celle du substrat naturel (Pierrel et al., 1994). Les substrats naturels des CYP76Cs que j'ai étudiés n'étaient pas encore identifiés. Mes recherches ont permis d'identifier plusieurs substrats alternatifs : le chlortoluron, l'isoproturon et la 7-éthoxycoumarine, ce qui indiquait que les substrats naturels pourraient être semblables à ces molécules, c'est-à-dire, des molécules petites, planes et peut-être possédant des cycles.

Conclusion

Mon travail a très clairement démontré que les membres de la famille CYP76 sont capables de métaboliser plusieurs molécules qui ne sont pas produites par les plantes. **Ces résultats montrent que certaines enzymes végétales de la famille des P450s disposent d'activités opportunistes** et expliquent l'adaptation des plantes à un environnement potentiellement toxique pour elles.

Bilan

Depuis la réalisation de ce travail, il a été établi que la fonction naturelle des CYP76Cs d'*A. thaliana* est l'oxydation de monoterpènes (Ginglinger et al., 2013; Höfer et al., 2014; Boachon et al., 2015).

De manière générale, les travaux sur cette famille CYP76C, ainsi que des travaux réalisés ultérieurement par un certain nombre de thésards et postdoctorants du laboratoire, ont été valorisés

dans un article pour lequel je suis co-auteur : B Boachon, RR Junker, L Miesch, **J-E Bassard**, R Hoefler, R Caillieaudeau, DE Seidel, A Lesot, C Heinrich, J-F Ginglinger, L Allouche, B Vincent, DSC Wahyuni, C Paetz, F Beran, M Miesch, B Schneider, K Leiss, D Werck-Reichhart (2015) *Plant Cell* 27(10): 2972-2990.

Etude fonctionnelle des CYP98As et CYP73As chez Nicotiana tabacum et Arabidopsis thaliana

Introduction

La voie des phénylpropanoïdes est décrite comme une succession d'hydroxylations, méthylations et réductions, organisée en réseau métabolique (non-linéaire) impliquant de nombreuses branches alternatives (Abdulrazzak et al., 2006; Ehling et al., 2008; Matsuno et al., 2009). Les CYP73As et les CYP98As sont des familles de P450s, qui depuis leur découverte, sont décrites comme impliquées dans la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Lors de ma thèse et mon postdoctorat à l'IBMP, j'ai étudié les fonctions de ces deux familles de P450s chez *Nicotiana tabacum* et *Arabidopsis thaliana*.

Je vais tout d'abord introduire rapidement ces deux familles qui étaient parmi les P450s considérés comme les mieux caractérisés.

La famille CYP73

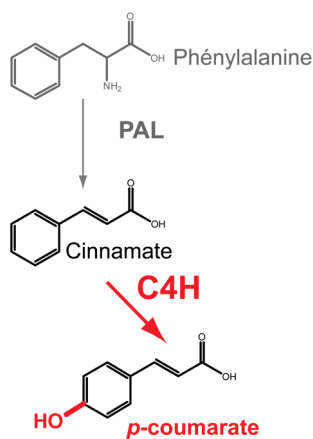


Figure 7. Réaction canonique des CYP73As comme cinnamate 4-hydroxylase (C4H) dans la voie des phénylpropanoïdes

L'un des premiers P450s de plante caractérisé fut la *t*-cinnamate hydroxylase ou cinnamate 4-hydroxylase (Nair and Vining, 1965). En 1993, les premiers cDNA de ce P450 ont été isolés simultanément par différentes équipes (Mizutani et al., 1993; Teutsch et al., 1993; Fahrendorf and Dixon, 1993) et ce P450 est encodé par un gène *CYP73A*. Maintenant des centaines de *CYP73As* sont listés dans les bases de données. Des séquences de *CYP73As* ont été trouvées dans les génomes de toutes les plantes séquencées, des mousses aux angiospermes. La majorité de ces séquences sont très similaires. Les *CYP73As* étaient considérés comme les P450s de plantes les mieux caractérisés. Ils catalysent tous la 4-hydroxylation du cinnamate (Urban et al., 1994; Pierrel et al., 1994; Gravot et al., 2004), la seconde étape de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes (Figure 7). Aucune activité catalytique n'avait pu être détectée sur d'autres molécules phénoliques (Pierrel et al., 1994; Overkamp et al., 2000; Chen et al., 2007). Cependant

ils sont capables de métaboliser avec une faible efficacité de petites molécules aromatiques planes et chargées négativement substituées ou non en position 2 et 3 (Figure 8), comme l'herbicide chlortoluron, et d'autres xénobiotiques : 7-éthoxycoumarine, *p*-chloro-*N*-méthylaniline, acide 2-naphtoiique (Pierrel et al., 1994; Schalk et al., 1997a, 1997b). Ils furent les premiers P450s de plantes à être associés spécifiquement à une fonction physiologique. Les *CYP73As* sont exprimés constitutivement et sont parmi les plus abondants, mais ils sont plus fortement exprimés dans les tissus lignifiés comme les tiges, les racines et les siliques (Mizutani et al., 1997; Urban et al., 1997; Bell-Lelong et al., 1997). Leur expression est accrue sous l'action de certains stress, comme les UV, la blessure et l'élicitation (Teutsch et al., 1993; Nedelkina et al., 1999; Hemm et al., 2004; Schillmiller et al., 2009). L'expression des *CYP73As* est coordonnée avec celle des autres gènes de la voie des phénylpropanoïdes (Ehling et al., 2005). Du fait de l'importance des *CYP73As* dans le développement des plantes, les mutants de ces gènes n'ont été décrits que récemment (Schillmiller et al., 2009). Les mutants nuls sont létaux. La sévérité de la mutation dépend de l'allèle et seuls des mutants « faibles » ont pu être caractérisés. Au niveau moléculaire, les mutants ont une quantité de lignine fortement diminuée, ce qui provoque une déstabilisation du xylème, et une modification du profil des phénylpropanoïdes solubles. Les mutants stériles semblent liés à un avortement du pollen, résultant

probablement d'une déficience dans la déposition de sporopollénine dans le manteau pollinique. Toutes ces données fonctionnelles sont en accord avec la position du CYP73A en amont de la voie de biosynthèse, et donc de son rôle critique dans la régulation et la redirection du flux de carbone du métabolisme primaire à la voie des phénylpropanoïdes.

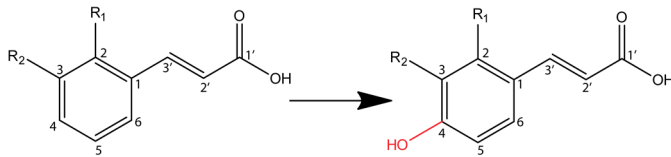


Figure 8. Cinnamate et ses analogues, hydroxylés par les CYP73As

L'hydroxylation en position 4 est indiquée en rouge. Différents groupements peuvent être présents en R1 et R2.

indiquaient également que le 3-coumarate et divers analogues du cinnamate substitués en positions 2 et 3 pouvaient être métabolisés par les CYP73As (Figure 8)(Chen et al., 2007).

Au début de mes travaux de recherche dans le laboratoire, l'explosion du nombre de séquences de CYP73As dans les bases de données a révélé l'existence de duplications de CYP73As chez certaines plantes, ainsi que la présence de séquences divergentes au sein de cette famille. Des données

La famille CYP98

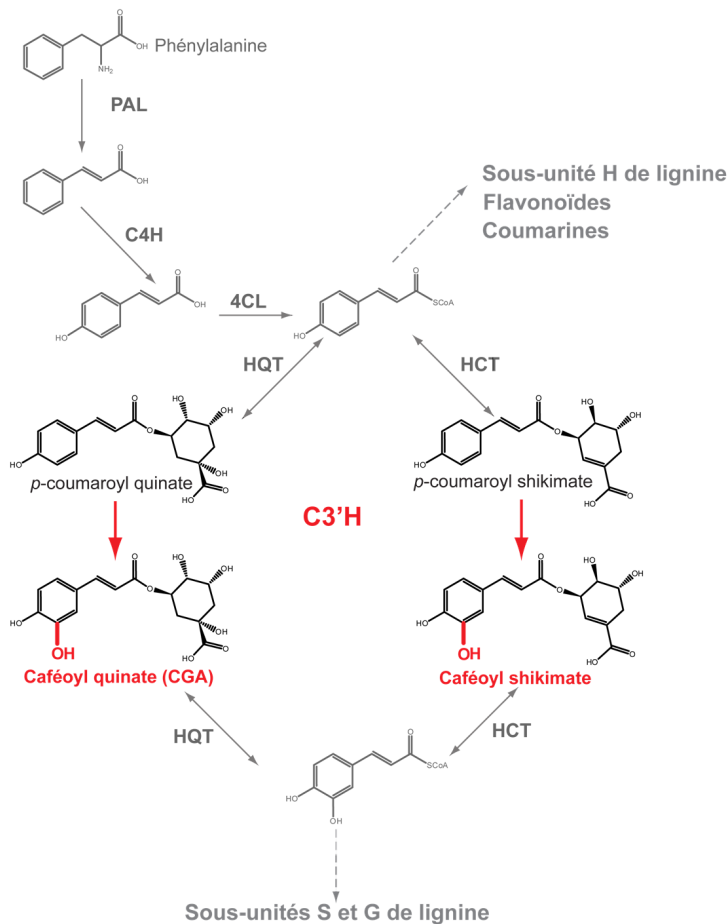


Figure 9. Réactions canoniques des CYP98As comme *p*-coumaroyl 3'-hydroxylase (C3'H) dans la voie de la lignine.

CGA : acide chlorogénique

produisent des quantités significatives d'unités S et G de la lignine (Figure 9), suggérant une voie alternative pour la biosynthèse de ces unités de lignine (Abdulrazzak et al., 2006).

Les CYP98As sont présents chez toutes les plantes terrestres, des mousses, aux Gymnospermes et aux Angiospermes. La localisation de l'expression, des premiers CYP98As identifiés, associée aux tissus en lignification, suggéra leur implication dans la biosynthèse de la lignine (Schoch et al., 2001; Franke et al., 2002).

En effet, les CYP98As, à leur découverte, furent décrits comme des *p*-coumaroyl ester 3'-hydroxylases (Figure 9)(Schoch et al., 2001; Franke et al., 2002; Nair et al., 2002). Ils convertissent ainsi le *p*-coumaroyl shikimate et le *p*-coumaroyl quinate en leur esters caféiques respectifs.

Les mutants du CYP98A3, premier CYP98A caractérisé, montrent une inhibition de la croissance de la plante, corrélée avec une diminution de la quantité de lignine et une accumulation de flavonoïdes glycosylés et d'anthocyanines. Les mutants nuls sont males stériles, et malgré tout,

Au début de mes travaux de recherche, une trentaine de séquences de *CYP98As* provenant de différentes plantes (allant des mousses à *Arabidopsis*) avaient été identifiées. Une divergence de

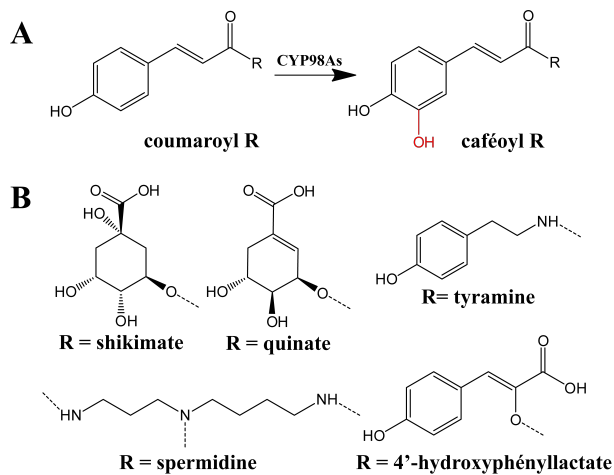


Figure 10. Substrats pour la *meta*-hydroxylation par les *CYP98As*

A. Réaction catalysée.

B. Esters ou amides de la chaîne R des divers substrats décrits dans la littérature.

séquences fut notée par rapport aux premières séquences caractérisées, et dans certaines plantes, plusieurs paralogues sont présents. De plus, des données récentes montraient que les esters de quinate et shikimate n'étaient pas les seuls substrats pouvant être métabolisés par les *CYP98As*, mais des phénolamides ou d'autres esters phénoliques pouvaient aussi l'être (Figure 10)(Gang et al., 2002; Matsuno et al., 2002; Mahesh et al., 2007; Eberle et al., 2009). La 3'-hydroxylation de divers métabolites dans la même plante (ou dans des plantes différentes), indiquait une plus grande complexité fonctionnelle que ce qui était envisagé, avec sans doute des branchements additionnels dans le réseau métabolique des phénylpropanoïdes.

N. tabacum (tabac) est représentatif des *Solanaceae*, ainsi de nombreuses plantes avec un intérêt économique comme la tomate, la pomme de terre, l'aubergine. Ces plantes accumulent des phénylpropanoïdes spécifiques dans leurs tissus. Dans le tabac, l'acide chlorogénique (*trans*-5-O-caféoyl quinate) est l'un des composés phénoliques les plus abondants. Il pourrait servir de stockage de carbone ou d'antioxydant, et il s'accumule durant la maturation du fruit (pour sa protection ?). La voie de biosynthèse le produisant fait potentiellement intervenir un *CYP98A*, qui hydroxylerait en 3' le *p*-coumaroyl quinate directement en acide chlorogénique (Figure 9).

Chez le tabac, comme chez d'autres plantes, des phénolamides s'accumulent dans des tissus spécifiques et semblent participer à la fertilité, la croissance, le développement de la paroi cellulaire et la défense. Ces phénolamides sont ainsi considérées comme une classe majeure de métabolites spécialisés. Ce sont des molécules qui partagent les propriétés des polyamines et des phénylpropanoïdes. Des *CYP98As* pourraient hydroxyler la partie phénolique de ces molécules.

Travaux réalisés

Mon projet était destiné à comprendre les fonctions respectives des différents membres des deux sous-familles de P450s, *CYP73As* et *CYP98As*, chez *Nicotiana tabacum*. L'analyse des bases de données publiques disponibles à cette époque avait montré que chacune de ces deux familles de P450s était composée de deux clades de paralogues, chez le tabac, comme chez la plupart des autres espèces végétales (sauf *Arabidopsis*). Ceci semblait indiquer que nous étions devant une plus grande complexité fonctionnelle et métabolique que ce qui avait été décrit jusque-là. Deux hypothèses furent proposées : soit une différence de fonction catalytique entre les membres des deux clades, soit les différents membres de chacune des deux sous-familles ont une même fonction enzymatique, mais une spécificité d'expression propre (organe, tissus, compartiment subcellulaire, réponse aux stress). Pour vérifier ces hypothèses, j'ai réalisé un travail approfondi sur les trois paralogues de *CYP98A* et les quatre paralogues de *CYP73A* présents chez *N. tabacum*.

Pour valider la première hypothèse, après avoir produit les protéines dans le système d'expression levure, j'ai réalisé un criblage métabolique *in vitro* en utilisant une trentaine de substrats disponibles au laboratoire (divers esters phénoliques et phénolamides). Pour étendre notre chimiothèque et élargir nos études à d'autres structures moléculaires, j'ai réalisé la synthèse chimique de nouvelles

molécules dérivées du cinnamate ou du *p*-coumaroyl. Ce travail a été accompli avec l'aide du Laboratoire d'Innovations Thérapeutiques (UMR7200, Université de Strasbourg). Les activités catalytiques des P450s des deux sous-familles ont été comparées entre *N. tabacum* et *A. thaliana*. Mes résultats ont confirmé l'implication de certains CYP98As dans la biosynthèse de phénolamides. Mais, les activités enzymatiques ont été conformes aux attentes et assez peu différenciées entre les différents paralogues, du moins en ce qui concerne les substrats testés. Le substrat préférentiel des

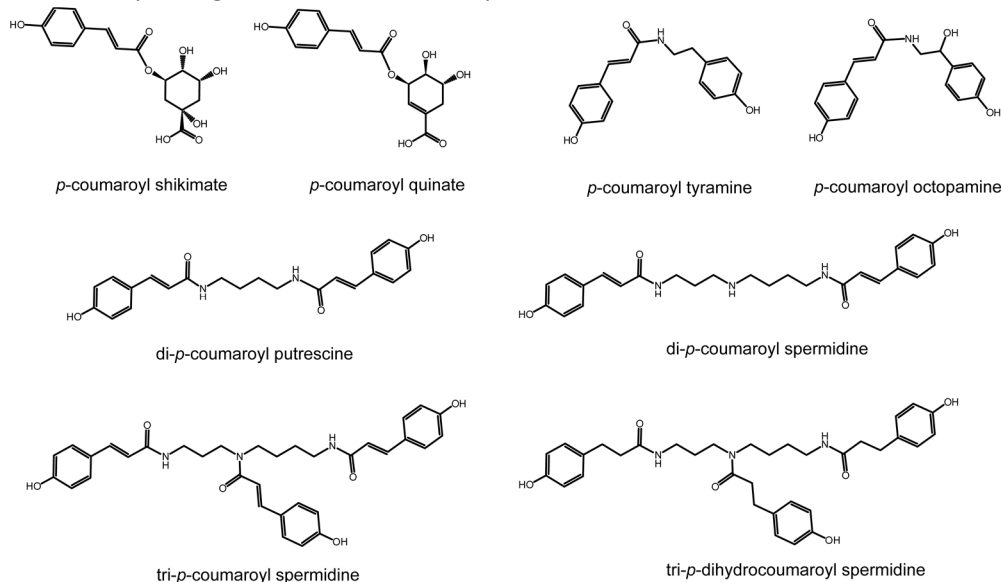


Figure 11. Formules des principales molécules métabolisées par les CYP98As de *N. tabacum*

trois CYP98As de tabac est le *p*-coumaroyl shikimate (Figure 11). De plus, CYP98A31 et CYP98A33 (représentants des deux clades) peuvent également métaboliser des esters et amides très variés, du *p*-coumaroyl shikimate, à divers composés

phénolamides di- et tri-substitués par des *p*-coumaroyls. Finalement, les enzymes appartenant au clade 2 semblent avoir la capacité de métaboliser la *p*-coumaroyl octopamine. Ainsi, les CYP98As présentent une grande plasticité catalytique, ils sont capables d'hydroxyler un panel très varié d'esters et d'amides de *p*-coumaroyl. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec la sous-famille CYP76C et présentent donc un second exemple de P450s à large spectre de substrats.

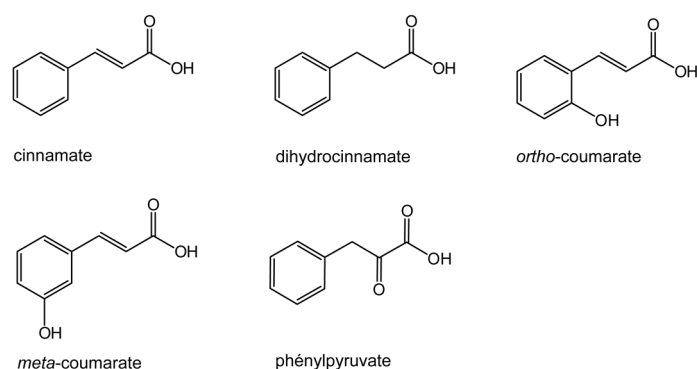


Figure 12. Formules des molécules métabolisées par les CYP73As de *N. tabacum*

Les activités enzymatiques des CYP73As ont été conformes aux précédentes études (métabolisation préférentielle du cinnamate en *p*-coumarate ; Figure 12) et je n'ai pas pu identifier de différenciation catalytique entre les paralogues, du moins en ce qui concerne les substrats testés, qui représentent une centaine d'analogues naturels et non-naturels du cinnamate.

Ces analyses de fonctions catalytiques ont ainsi révélé une très forte sélectivité de substrats pour les CYP73As qui s'oppose à la très grande plasticité pour les CYP98As.

Pour tester la seconde hypothèse, j'ai mis en œuvre un ensemble d'approches complémentaires. Le profil d'expression des différents CYP73As et CYP98As a été déterminé par qRT-PCR, durant le développement du tabac, dans les différents organes et tissus floraux et en réponse à différents stress biotiques (Virus de la Mosaïque du Tabac (VMT) ou éliciteur fongique (β -mégaspermine)) et abiotiques (sécheresse, faibles et hautes températures, forte salinité, faible et forte luminosité, stress oxydatif

(H₂O₂), médiateurs de réponse (méthyl-jasmonate, salicylate, acide abscissique)). Ces profils d'expression ont été mis en relation avec les profils métaboliques des tissus concernés, déterminés par Chromatographie Liquide Ultra Performante couplée à un spectromètre de masse (UHPLC-MS/MS). Des mutants de surexpression ont été générés afin de caractériser l'impact de la surexpression de ces gènes sur le phénotype et le métabolisme de la plante. Finalement, j'ai réalisé une analyse phylogénétique large des sous-familles CYP73A et CYP98A et j'ai également préparé des modèles par homologie des CYP73As de *N. tabacum*, (collaboration avec le Dr. Fabrice Klein, IGBMC, Strasbourg), pour visualiser l'évolution et l'adaptation de ces sous-familles d'enzymes.

Les résultats obtenus pour l'étude des CYP98As indiquent :

- que deux clades de CYP98As semblent coexister chez certaines plantes comme le tabac (Figure 13). Les résultats obtenus avec un test d'évolution laissent suggérer qu'une phase d'évolution rapide suivie d'une phase de stabilisation s'est produite dans une branche conduisant aux protéines du clade 2 du tabac,
- alors que certaines études montraient que des CYP98As pouvaient catalyser des réactions biochimiques multiples ou spécifiques (Gang et al., 2002; Matsuno et al., 2002; Mahesh et al., 2007; Eberle et al., 2009), aucune donnée n'indiquait le rôle de chaque clade. Le clade 2 n'étant pas présent chez toutes les plantes, ceci indiquait qu'il n'était pas essentiel, ou que la redondance de fonction ou la fonctionnalisation entre clades n'était limitée qu'à certaines familles de plantes. Chez *N. tabacum*, les 2 clades sont présents et un de ces clades pourrait être spécifiquement impliqué dans la biosynthèse de l'acide chlorogénique,
- que les patrons d'expression des différents *CYP98As* chez le tabac sont distincts durant le développement de la fleur et dans les divers organes du tabac,
- que *CYP98A30* du clade 2, qui s'exprime très faiblement dans les tissus sains, est activé durant la défense contre le virus de la mosaïque du tabac. Une induction de son expression fut également observée lors de divers stress,
- que l'expression de *CYP98A30* est la plupart du temps corrélée à celle de l'*HQT* (*hydroxycinnamoylCoA: quinate hydroxycinnamoyl transférase*) qui est impliquée dans la biosynthèse de l'acide chlorogénique. L'expression de *CYP98A31* (clade 1) a été le plus souvent corrélée à celle de l'*HCT* (*hydroxycinnamoylCoA: shikimate hydroxycinnamoyl transférase*), impliquée dans la biosynthèse de sous-unités de lignine, il semblerait donc que *CYP98A31* pourrait être impliqué dans la synthèse de la lignine. *CYP98A33* (clade 2) a une expression plus versatile et parfois redondante soit avec *CYP98A30* soit avec *CYP98A31*,
- qu'une surexpression dans la plante permet une surexpression des transcrits qui ne se traduit pas par une expression accrue de protéine. Il doit donc exister un mécanisme post-transcriptionnel (non déterminé) qui régule l'expression des enzymes de cette voie métabolique.

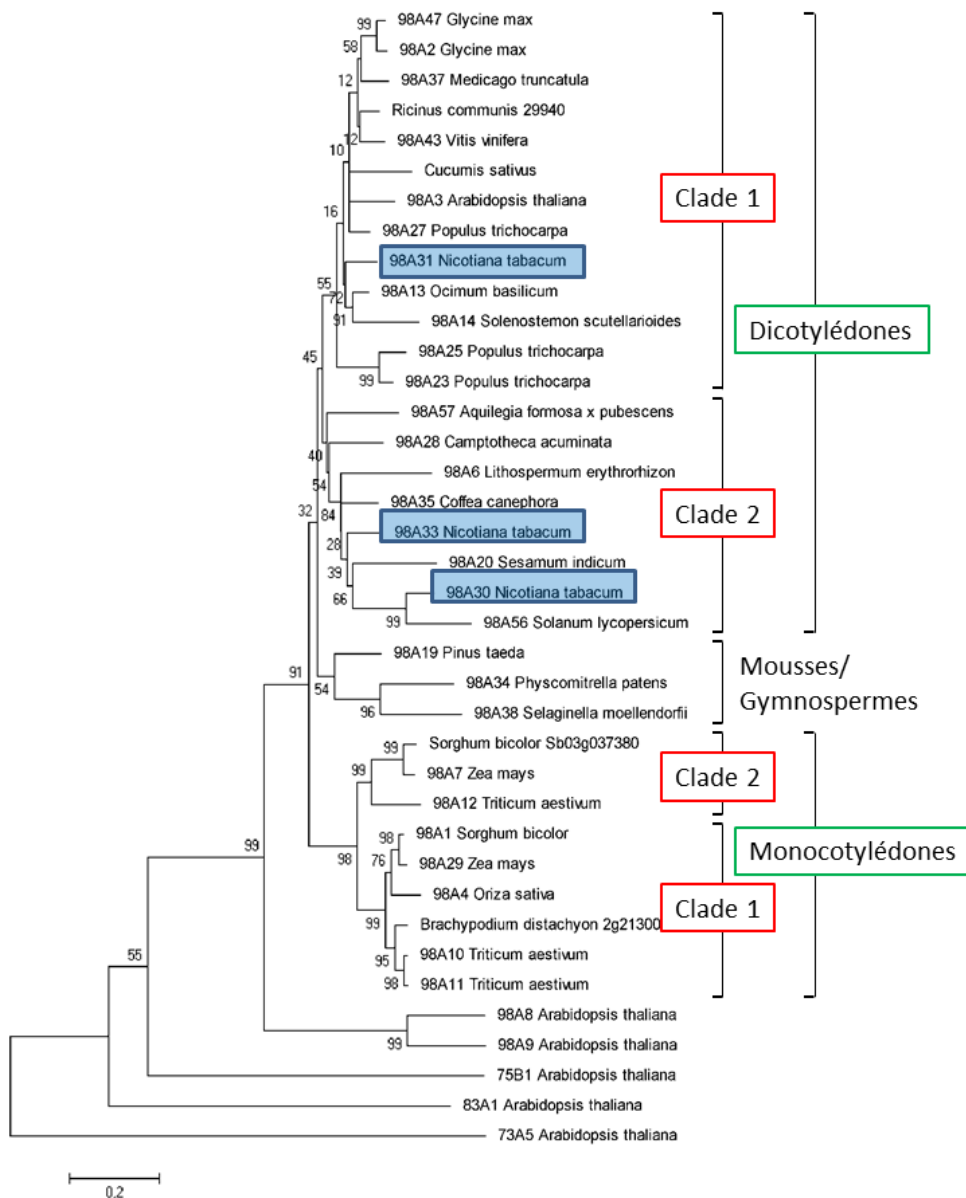


Figure 13. Analyse phylogénétique de la sous-famille CYP98A par la méthode du maximum de ressemblance
 Les séquences de *Nicotiana tabacum* sont surlignées en bleu.

Les résultats obtenus sur l'étude des CYP73As indiquent :

- une ancienne duplication génique des CYP73As, conservée chez la plupart des Monocotylédones et Dicotylédones, comme chez le tabac (Figure 14),

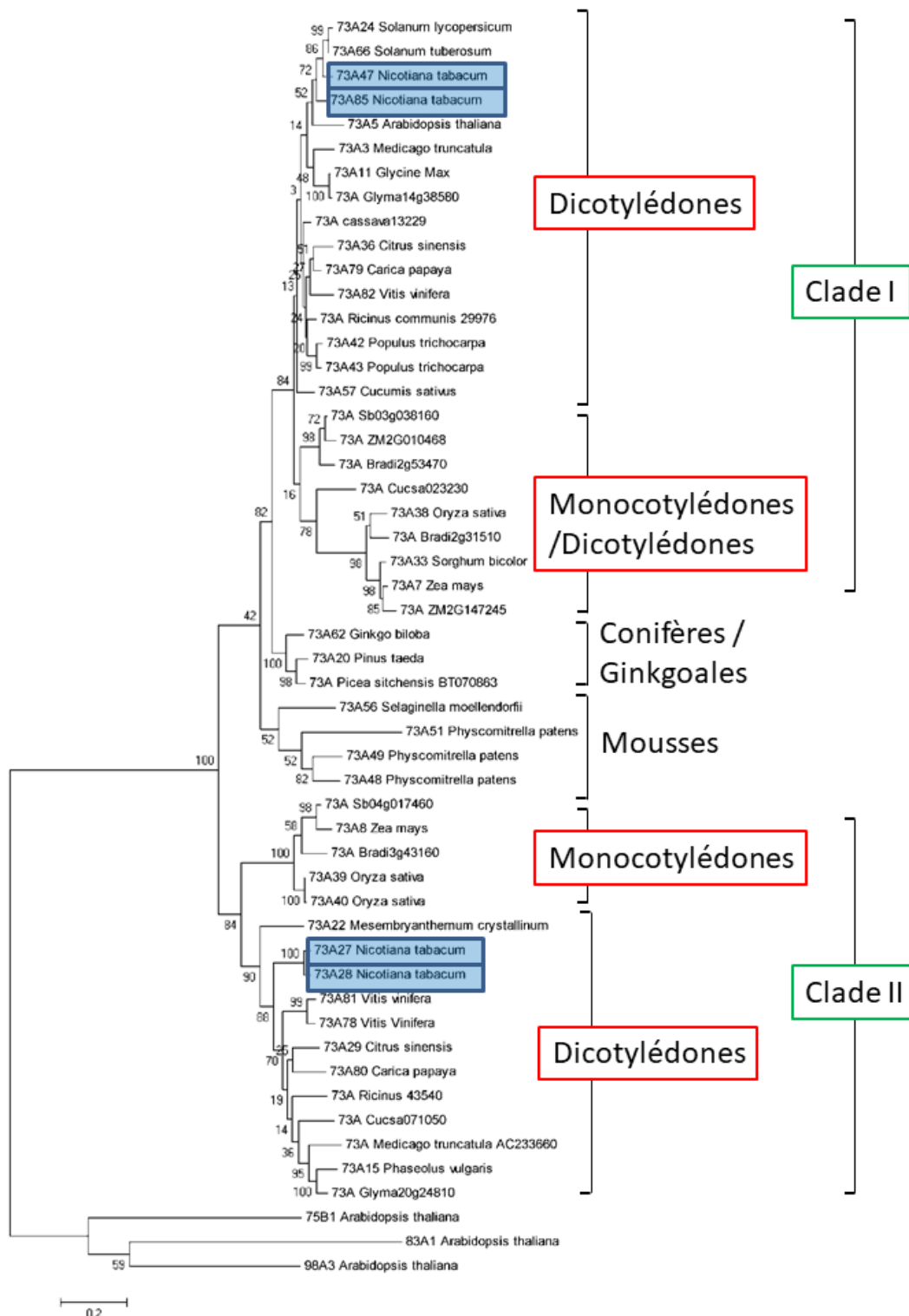


Figure 14. Analyse phylogénétique de la sous-famille CYP73A par la méthode du maximum de ressemblance
Les séquences de *Nicotiana tabacum* sont surlignées en bleu.

- que les divergences de séquences entre les 2 clades correspondent, à une ancre N-terminale atypique, une insertion de 3-4 acides aminés en amont de la cystéine servant à la fixation de l'hème, à un motif RMA (strictement conservé pour le clade I) et H-(T/S/A)-P (clade II) au niveau du site de reconnaissance du substrat (SRS5) dans le site actif, et à une importante modification des acides aminés en surface de la protéine. Il est à noter que les CYP73As de conifères, mousses et ginkgoales ont un motif intermédiaire (H/R)-M-(A/P) (Figure 15). Tout

ceci suggère une interaction avec différentes protéines partenaires, une localisation subcellulaire différente ou une différence de fonction biochimique entre les CYP73As de clade I ou II. De plus, les séquences des CYP73As de clade I sont très conservées, alors que celles de clade II sont très variables. Ce qui pourrait indiquer une néo-fonctionnalisation des CYP73As de clade II,

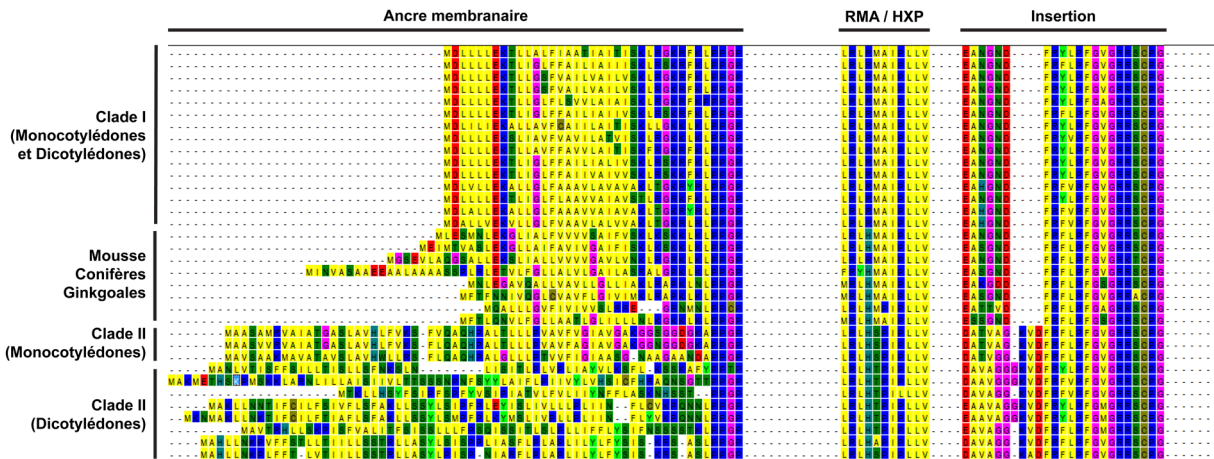


Figure 15. Différences majeures entre les séquences protéiques des clades I et II de CYP73As

- une localisation subcellulaire des CYP73As au niveau du RE, vérifiée par microscopie confocale, en dépit des prédictions contraires pour les membres du clade II, qui présentent une séquence d'adressage de type plastidiale,
- une distinction flagrante d'expression entre les deux clades, durant le développement de la fleur et dans les différents organes de la plante. Les gènes des membres du clade II sont exprimés dans les organes reproducteurs (fleurs, fruits). La plupart du temps, l'expression des CYP73As du clade I était associée à l'HCT et aux CYP98As du clade 1. Ainsi, ces membres semblent liés à la lignification. D'autre part, ces gènes ne sont pas induits par les mêmes stress, les CYP73As de clade I sont induits par le VMT, le méthyl-jasmonate et le froid, alors que les CYP73As de clade II sont induits par un stress salin,
- qu'une surexpression dans la plante permet une surexpression des transcrits qui ne se traduit pas par une expression accrue de protéine (comme pour les CYP98As). Ceci pourrait indiquer l'action d'un mécanisme post-transcriptionnel, non déterminé, qui régule l'expression de ces enzymes.

Conclusion

Mes résultats montrent que **les paralogues de CYP73As, mais également les paralogues de CYP98As, n'ont pas de fonction catalytique bien différenciée au sein de ces sous-familles.** D'après leurs spécificités d'expression, les CYP98As du clade 1 et les CYP73As du clade I, semblent avoir un rôle constitutif et agissent dans la voie de biosynthèse de la lignine. L'un des CYP98As du clade 2, faiblement exprimé dans les tissus sains, pourrait être impliqué dans la synthèse de l'acide chlorogénique lors de la mise en œuvre de mécanismes de défense. **Les CYP73As du clade II pourraient avoir un rôle dans le développement, la protection ou la reproduction de la fleur.**

Les différences de fonction des deux clades de CYP73As et CYP98As chez le tabac n'ont donc pas pu être totalement élucidées. En revanche, les CYP73As semblent être un bon modèle de P450s capables de garder une même fonction biochimique alors que leurs séquences protéiques peuvent être très divergentes.

Bilan

L'ensemble du travail conduit sur ce projet fut une étape vers la compréhension du rôle des deux clades de chacune des sous-familles CYP73As et CYP98As chez le tabac, mais également chez d'autres Angiospermes.

Les techniques que j'ai mises en œuvre et les substrats que j'ai synthétisés, m'ont permis de participer à la caractérisation de deux paralogues de CYP98As issus d'une rétroposition chez les Brassicaceae et responsable de la biosynthèse d'amides phénoliques, composants majeurs de la sporopollénine et du manteau pollinique.

L'ensemble de ces travaux ont fait l'objet de trois publications dont je suis coauteur :

- A Alber, H Renault, A Basilio Lopes, **J-E Bassard**, P Ullmann, A Lesot, F Bihel, M Schmitt, D Werck-Reichhart, J Ehlting *Plant Journal* (acceptée),
- **J-E Bassard**, P Ullmann, F Bernier and D Werck-Reichhart (2010) *Phytochemistry* 71(16): 1808-1824,
- M Matsuno, V Compagnon, G Schoch, M Schmitt, D Debayle, **J-E Bassard**, B Pollet, A Hehn, D Heintz, P Ullmann, C Lapierre, F Bernier, J Ehlting, D Werck-Reichhart (2009) *Science* 325(5948): 1688-1692.

L'ensemble de ces travaux sur *N. tabacum* et *A. thaliana* représente les prémices du projet « Phenowall » financé par l'ANR dans lequel j'ai été impliqué, notamment en participant à la rédaction. Ce projet visait à étudier le rôle des divers CYP98As et CYP73As chez *Brachypodium distachyon*, une monocotylédone modèle.

"Le projet est le brouillon de l'avenir. Parfois, il faut à l'avenir des centaines de brouillons."

Jules Renard

Chapitre 2 : Des gènes à la voie de biosynthèse

Introduction

Comme j'ai pu le mentionner dans l'introduction du métabolisme spécialisé des plantes, les molécules produites sont très souvent actives et, de fait, sont des molécules d'intérêt pour l'Homme. Si leur approvisionnement est maîtrisé, ces molécules représentent un intérêt majeur pour des applications pharmaceutiques, cosmétiques et nutraceutiques.

L'identification de molécules phénoliques bioactives, et la caractérisation des voies de biosynthèse permettant de les produire, ont été des objectifs majeurs du projet Européen FP7 BacHBERRY (From Bacterial Hosts for production of Bioactive phenolics from bERRY fruits to products) dans lequel j'ai été impliqué lors de mon postdoctorat et de la période pendant laquelle j'étais professeur assistant à l'Université de Copenhague.

Le métabolisme phénolique des plantes constitue un réservoir important et diversifié de molécules bioactives d'intérêt pour l'Homme avec une grande variabilité de structure et donc d'activité biologique d'une plante à l'autre (Richard A. Moyer et al., 2001; McDougall et al., 2008; Ruiz et al., 2010; Carvalho et al., 2013; Miladinović et al., 2014; Marhuenda et al., 2016; Ljevar et al., 2016). Par ailleurs, de plus en plus d'études associent la consommation de polyphénols végétaux à la prévention contre des maladies cardiovasculaires, des maladies neurodégénératives, voir des cancers (Goszcz et al., 2015). Le composé le plus connu est sans doute le resvératrol (*trans*-3, 5, 4'-hydroxystilbène), qui est associé à une protection contre les maladies coronariennes (Renaud and de Lorgeril, 1992; Catalgol et al., 2012) et à ce qui est appelé le « French Paradox ».

La diversité chimique des molécules phénoliques dans les baies, comme chez les autres plantes, découle de la variété des décorations du squelette phénolique de base, et inclut des hydroxylations, des *O*-méthylations, des prénylations, des migrations aryle, des glycosylations, des acylations et des polymérisations (Figure 16). Chacune de ces décorations peut affecter l'activité biologique, la stabilité et la bio-assimilation de ces molécules chez l'Homme.

Comme pour le marché des nutraceutiques, le marché des biomolécules phénoliques augmente substantiellement depuis quelques années et approchera les 2 milliards de Dollars US en 2023 (Market research future, 2018). Ceci s'explique par la prise de conscience des consommateurs au sujet des bénéfices liés à la consommation de polyphénols, et de l'augmentation de l'utilisation d'extraits phénoliques dans la nourriture, les boissons ou les cosmétiques (Khan et al., 2014; Grand View Research, 2016; Market research future, 2018). Cette demande croissante en polyphénols nécessite un système de production efficace et respectueux de la nature. En effet, aujourd'hui, la majeure partie de la production de polyphénols est basée sur l'extraction de ceux-ci depuis différentes plantes source (Wang et al., 2016) plus ou moins en danger, et via des processus complexes utilisant quelques fois des produits chimiques dangereux et toxiques.

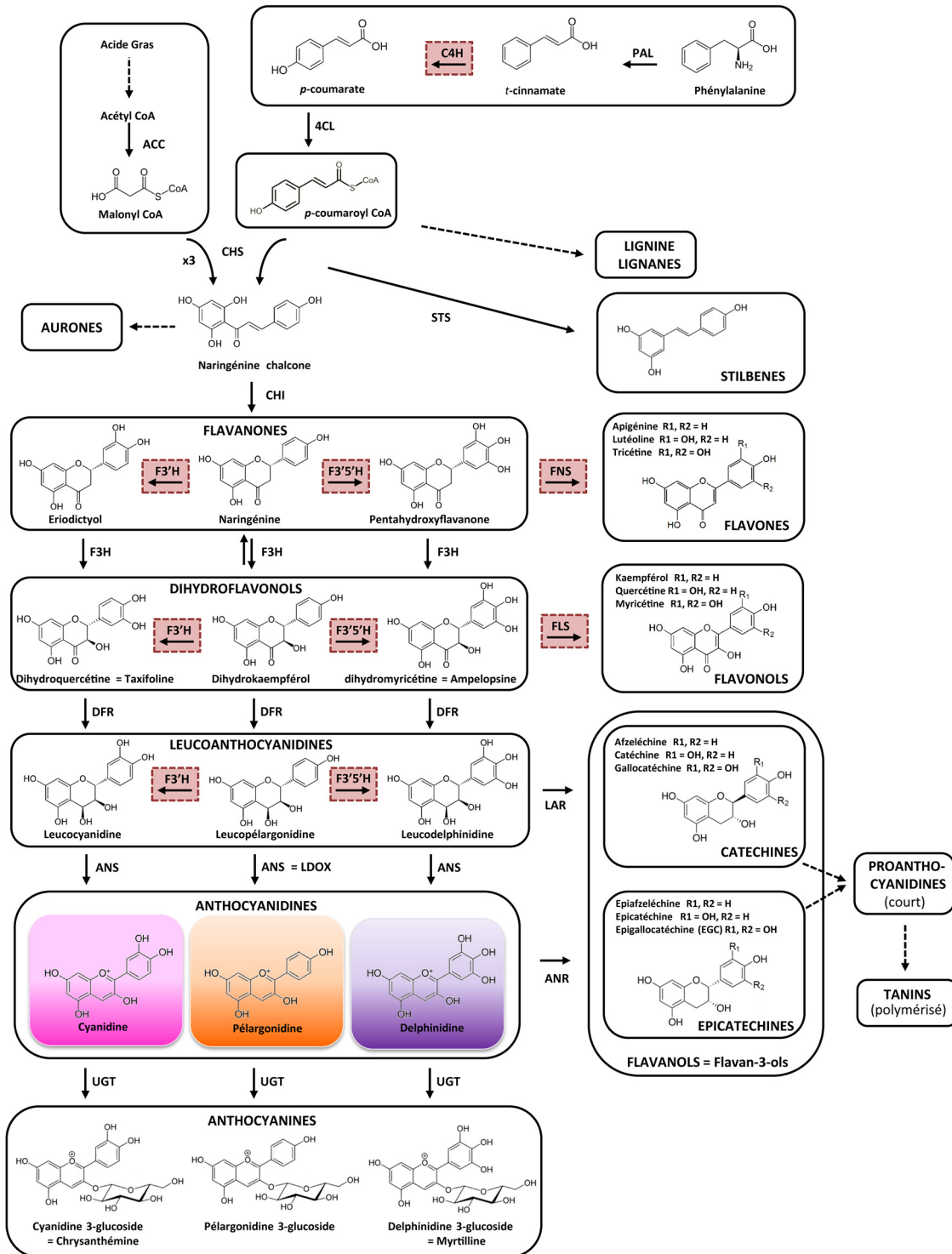


Figure 16. Métabolisme phénolique général chez les baies

PAL, phénylalanine ammonia-lyase ; C4H, cinnamate 4-hydroxylase ; 4CL, 4-coumaroyl-CoA ligase ; CHS, chalcone synthase ; CHI, chalcone isomérase ; F3H, flavanone 3-hydroxylase ; F3'5'H, flavonoïde 3'-5'-hydroxylase ; DFR, dihydroflavonol 4-réductase ; ANS, anthocyanidine synthase ; ANR, anthocyanidine réductase ; UGT, flavonoïde 3-O-glucosyltransférase ; LAR, leucoanthocyanidine réductase ; FNS, flavone synthase ; FLS, flavonol synthase ; STS, stilbène synthase. Les P450s sont surlignés en rouge.

Le projet BACHBERRY consistait à **identifier de nouveaux composés phénoliques d'intérêt économique** (colorants, médicaments ou compléments alimentaires) provenant de baies chez des plantes non-modèles (des genres : *Rubus*, *Ribes*, *Vaccinium*, *Ugni*, ...). Il visait à **élucider leurs voies de biosynthèse**, pour ensuite produire ces molécules dans une bactérie (*Lactococcus lactis* ou

Corynebacterium glutamicum), et à optimiser les souches de **production pour la pré-industrialisation de ces molécules identifiées.**

Ce projet s'est concentré sur 73 cultivars de baies, sous-exploités par l'Homme. Chacun a été testé pour différentes activités biologiques de ses extraits et composés (antioxydante, antibactérienne, anti-inflammatoire, anti-maladies neurodégénératives, antimitotique, ...). Sur l'ensemble des candidats, 17 cultivars (*Aristotelia chilensis*, *Berberis microphylla*, *Corema album*, *Fragaria × ananassa*, *Lonicera caerulea*, *Lycium chinense*, *Ribes muravushka*, *Ribes nigrum ben hope*, *Ribes nigrum sibiricum*, *Rubus fruticosus*, *Rubus genevierii*, *Rubus idaeus L. Octavia*, *Rubus idaeus L. Prestige*, *Rubus vagabundus*, *Ugni molinae*, *Vaccinium uliginosum*, *Vaccinium corymbosum*), donnant des activités biologiques significatives par rapport aux molécules de référence, ont été retenus pour élucider certaines voies de biosynthèse phénoliques.

Travaux réalisés

De nombreux gènes codant pour des enzymes impliquées dans la décoration de flavonoïdes, anthocyanines et stilbènes avaient déjà été caractérisés chez diverses plantes (Tohge et al., 2005; Luo et al., 2007; Pandey et al., 2016; Wang et al., 2016). Leurs séquences furent utilisées comme références dans ce projet. Pour les décorations réalisées par des enzymes non-répertoriées, la corrélation de l'expression des gènes et de l'accumulation des molécules durant les différents stades du développement du fruit fut utilisée pour établir une liste de gènes potentiellement impliqués dans la voie de biosynthèse cible.

J'ai réalisé l'**analyse des données de transcriptomique** et j'ai **proposé les voies de biosynthèse possibles** conduisant aux molécules d'intérêt prometteuses, sélectionnées durant les premières phases du projet BACHBERRY.

Durant ce travail j'ai **codéveloppé un outil bioinformatique**, MassBlast, qui est disponible en licence GNU-GPL3 (<https://averissimo.github.io/mass-blast/>)(Figure 17). Il permet d'accélérer et de normaliser l'annotation et la curation d'un grand nombre de données de transcriptomique ou de

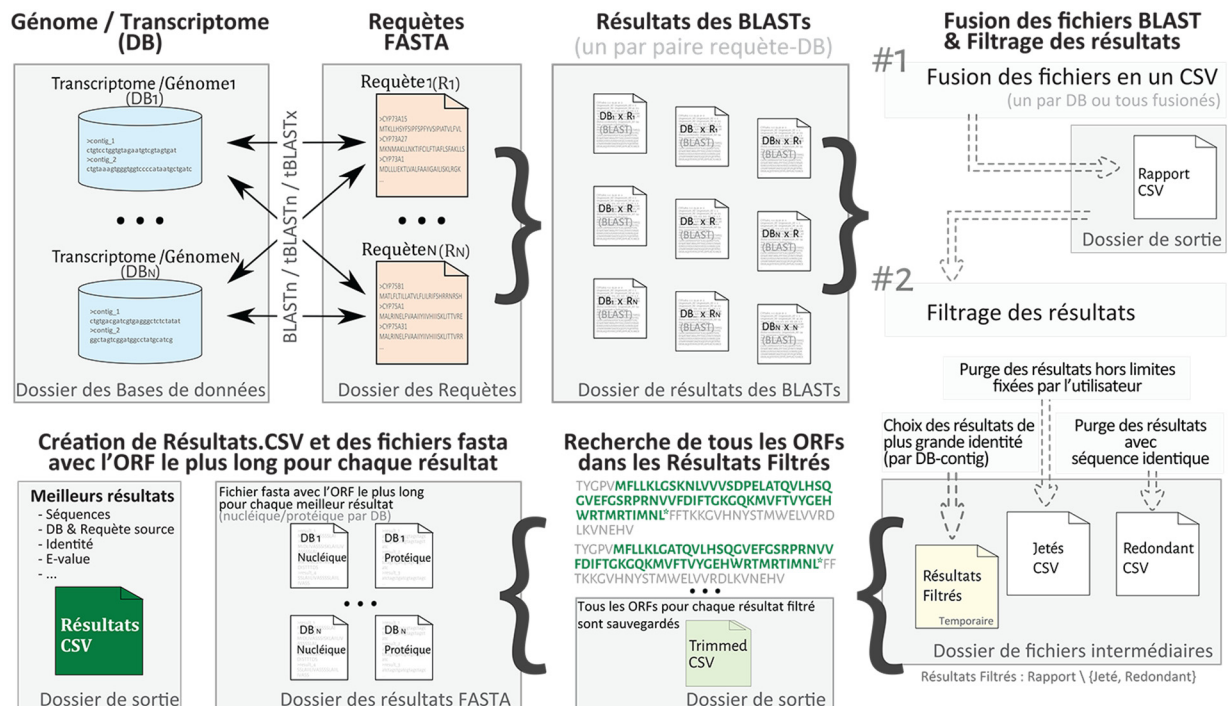


Figure 17. Résumé du fonctionnement de MassBlast

Chaque option et chaque filtre sont personnalisables par l'utilisateur. A la fin du processus, MassBlast peut également ajouter dans le fichier de résultats (résultats.CSV) des informations supplémentaires contenues dans un fichier source indépendant, comme les valeurs FPKM des contigs.

génomique, en automatisant les recherches BLAST, ainsi que le filtrage des résultats des BLASTs. Par exemple, avec cet outil, il est possible d'annoter précisément l'ensemble des P450s d'un transcriptome en moins de cinq minutes sur un ordinateur personnel, en utilisant comme référence un fichier FASTA contenant une ou plusieurs séquences de chacune des familles et sous-familles connues de P450s.

En utilisant cet outil, j'ai pu identifier 4475 gènes codant pour des P450s, des dioxygénases 2-oxoglutarate-dépendante (2OGDs), des UDP-glycosyltransférases (UGT), des BAHD acyltransférases et des *O*-méthyltransférases (OMT) chez les 17 cultivars d'intérêt, certaines statistiques sont présentées dans le Tableau 2. A cette liste s'ajoutent 1232 facteurs de transcription potentiellement importants dans le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de molécules phénoliques, comme des R2R3-MYB, bHLH et bZIP. Sur ces 5707 gènes potentiels, j'ai cloné plus de 100 gènes (principalement des UGTs, des P450s et des OMTs) et, en association avec l'un des partenaires industriels (Evolva (Suisse)), j'ai caractérisé d'un point de vue fonctionnel les protéines correspondantes, avant de les transmettre aux autres partenaires (John Innes Center (Royaume Uni), Danmarks Tekniske Universitet (Danemark), Juelich (Allemagne)).

Familles d'enzymes	Candidats par transcriptome (min-max)
Etapes enzymatiques conservées des phénylpropanoïdes (PAL, C4H, 4CL, C3'H, ...)	109-180
Cytochromes P450	100-177
UDP-glycosyltransférases	70-145
2-oxoglutarate dioxygénases	32-88
<i>O</i> -méthyltransférases	8-51
Acyltransférases	23-36

Tableau 2. Statistiques concernant cinq familles d'enzymes majeures du métabolisme spécialisé et d'étapes biochimiques centrales du métabolisme des phénylpropanoïdes

Les candidats retenus ont au moins 70% d'identité de séquence protéique avec les séquences utilisées en référence. PAL, phénylalanine ammonia liase ; C4H, cinnamate 4-hydroxylase ; 4CL, 4-coumarate CoA ligase ; C3'H, *p*-coumaroyl 3'-hydroxylase.

Conclusion

Les résultats majeurs du projet BachBERRY résident dans la construction d'une vaste base de données (métabolomique et transcriptomique) concernant des baies sous-exploitées par l'Homme. Des méthodes de criblage haut-débit des activités biologiques d'extraits de plantes, ou de molécules pures, ont été développées. Le métabolisme des châssis *L. lactis* et *C. glutamicum* a été adapté pour la production de composés phénoliques. Plusieurs outils bioinformatiques ont été développés, par exemple pour élucider les voies de biosynthèse, optimiser les séquences nucléotidiques utilisées pour la transformation des souches de production, ou pour optimiser le métabolisme de l'hôte pour la production de molécules d'intérêt.

L'ensemble de ces techniques et outils sont directement utilisables pour d'autres projets ayant l'objectif de produire des molécules phénoliques dans les châssis précédemment cités, ou avec quelques modifications, afin de produire des molécules phénoliques dans d'autres châssis.

Bilan

Le projet BachBerry, financé par la Commission Européenne, était un projet multinational et pluridisciplinaire de trois ans, qui a regroupé douze équipes académiques et six entreprises, originaires de onze pays différents. En tant que membre du comité de pilotage j'ai participé à l'arbitrage des choix techniques, à la sélection des molécules cibles, au management du projet et à la rédaction des rapports.

Les travaux auxquels j'ai été associé sont encore en cours de valorisation :

- BacHBERRY consortium (2017) *Phytochemistry reviews* 17: 291-326),
- A Veríssimo*, J-E Bassard*, A Julien-Laferrière, M-F Sagot, S Vinga. (2017) *bioRxiv* doi: 10.1101/131953 *co-premier auteurs,
- Un manuscrit en préparation et un site internet en construction.

Durant ce travail j'ai codéveloppé un outil bioinformatique, MassBlast. J'ai présenté cet outil lors d'une conférence au « XXVIIIth International Conference on Polyphenols ».

Ce projet m'a également permis d'élargir mon réseau scientifique à des unités de recherche publiques et privées spécialisées :

- dans le domaine de la bioinformatique (Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, Université Lyon 1 et IdMEC Portugal),
- dans la caractérisation fonctionnelle de facteurs de transcription (John Innes Centre (Royaume Uni)),
- dans les analyses métaboliques (James Hutton Institute (Royaume Uni)),
- dans l'expression et la caractérisation de gènes dans les levures (Société Evolva (Suisse)).

Enfin, j'ai eu des participations mineures à d'autres projets d'étude de voies de biosynthèse et de biologie synthétique pour la production de molécules d'intérêt, comme le projet "PlantPower" (financé par Innovation Fund Denmark). Ce projet a impliqué l'Université de Copenhague et des entreprises, il avait pour objectif de créer des châssis mousses et cyanobactéries pour la production, couplée à la photosynthèse, de terpénoïdes d'intérêt pharmaceutique.

Ces travaux ont été à l'origine de quatre publications dont je suis coauteur :

- L Dong, J Pollier, J-E Bassard, G Ntallas, A Almeida, E Lazaridi, B Khakimov, P Arendt, LS de Oliveira, F Lota, A Goossens, F Michoux, S Bak. (2018) *Metabolic Engineering*. 49: 1-12,
- A Almeida, L Dong, B Khakimov, J-E Bassard, T Moses, F Lota, A Goossens, G Appendino, S Bak. (2017) *Plant Physiology*. 176: 1469-1484,
- BC King, K Vavitsas, NK Ikram, J Schrøder, LB Scharff, J-E Bassard, BR Hamberger, PE Jensen, HT Simonsen (2016) *Scientific Reports* 6: 25030,
- SS Bach, J-E Bassard, J Andersen-Ranberg, ME Møldrup, and BR Hamberger (2014) *Methods in Molecular Biology* Volume Plant Isoprenoids, 1153: 245-255.

"Aucun de nous ne sait ce que nous savons tous, ensemble." Euripide

Chapitre 3 : Des gènes aux métabolons

Introduction

Les métabolons ont été définis comme des complexes supramoléculaires formés d'enzymes séquentielles d'une voie de biosynthèse, pouvant être associés à des éléments structuraux (Srere, 1987). Certains métabolons impliqués dans le métabolisme primaire ont été bien étudiés, comme le purinosome (Kyoung et al., 2015; Chan et al., 2015, 2018), le complexe de la β -oxydation (Ishikawa et al., 2004), le complexe GAPDH/PRK/CP12 du cycle de Benson-Calvin impliqué dans l'assimilation du CO₂ (Graciet et al., 2004), la synthèse du pyruvate (Graham et al., 2007). Dans ces cas, les associations entre enzymes peuvent être très stables, ce qui facilite l'étude de ces métabolons. En revanche, les métabolons du métabolisme spécialisé semble faire intervenir des interactions protéine-protéine moins stables que celles du métabolisme primaire.

Du fait de la nature transitoire des métabolons du métabolisme spécialisé, des preuves directes de leur existence sont difficiles à obtenir. Les interactions faibles qui sont engagées entre leurs enzymes empêchent d'isoler directement ces complexes par purification d'extraits de plantes en utilisant des détergents. Les preuves de leur formation sont généralement indirectes, ce qui a conduit parfois à un scepticisme d'une part de la communauté scientifique (Ro and Douglas, 2004). Au contraire, certains auteurs considèrent que le résultat évolutionniste de la formation des métabolons est représenté par la fusion d'enzymes catalysant une séquence de réactions biochimiques en un seul polypeptide, comme la tryptophane synthase (activités d'aldolase et transférase) ou l'acide gras synthase (regroupant des activités d' α -ketoacyl synthase; d'acetyl transacylase; de malonyl transacylase; d' α -hydroxyacyl hydratase; d'enoil reductase; d' α -ketoacyl reductase; d'acyl carrier protein; de thioestrase) (Srere and Ovadi, 1990).

Dans le cas du métabolisme spécialisé des plantes, de nombreuses preuves indirectes de la formation de métabolons ont été décrites pour certaines voies de biosynthèse, comme la voie des flavonoïdes, le métabolisme des glucosides cyanogéniques (Winkel, 2004; Jørgensen et al., 2005), le métabolisme des polyamines (Panicot et al., 2002), mais l'un des exemples les plus documentés au début de mes activités de recherche était l'entrée de la voie des phénylpropanoïdes (Winkel-Shirley, 1999; Jørgensen et al., 2005; Ralston and Yu, 2006).

Le concept de la formation de métabolons va de pair avec le concept de la canalisation métabolique. C'est un processus durant lequel, un intermédiaire métabolique produit par une première enzyme est transféré à une seconde enzyme sans diffusion dans le cytosol (Miles et al., 1999). Ceci suppose donc une organisation physique des enzymes successives. La canalisation métabolique offre certains avantages pour la cellule (Srere, 1987; Jørgensen et al., 2005; Ralston and Yu, 2006), elle permet de :

- se protéger des intermédiaires toxiques ou de protéger les intermédiaires labiles,
- optimiser les concentrations en enzymes et substrats, et donc d'augmenter les rendements catalytiques,
- isoler les intermédiaires d'autres réactions compétitives et donc de coordonner les interconnexions métaboliques impliquant des enzymes participant à plusieurs voies de biosynthèse,
- avoir un niveau de régulation supplémentaire du métabolisme.

La première preuve de canalisation métabolique dans le métabolisme spécialisé des plantes fut obtenue en 1975 par utilisation de précurseurs radiomarqués avec le couple Phénylalanine Ammonia Liase - Cinnamate 4-Hydroxylase (PAL-C4H), les deux premières enzymes de la voie des phénylpropanoïdes (Czichi and Kindl, 1975). Ensuite de nombreuses études utilisant des techniques d'incorporation de précurseurs radiomarqués, de co-immunoprécipitation, de co-isolation, de

colocalisation ont confirmé ces résultats préliminaires (Czichi and Kindl, 1977; Hrazdina and Wagner, 1985; Rasmussen and Dixon, 1999; Achnine et al., 2004).

L'ensemble des travaux réalisés et plus particulièrement les analyses transcriptomiques comparées aux données métaboliques montre que le nombre d'enzymes (plusieurs centaines) codées par les génomes de plantes ne permet pas d'expliquer la diversité des molécules qui y sont synthétisées (de l'ordre de plusieurs milliers). Pour expliquer ce constat, l'hypothèse est que cette diversité métabolique résulte de la **formation combinatoire et transitoire de métabolons permettant une canalisation des flux métaboliques** vers diverses branches du métabolisme et divers compartiments cellulaires (Winkel-Shirley, 1999; Jørgensen et al., 2005). Ce type d'organisation a d'importantes implications sur l'efficacité et la spécificité du métabolisme, en permettant à la cellule d'optimiser les rendements enzymatiques, mais aussi de contrôler finement son métabolisme. **Une cellule ou une voie de biosynthèse ne serait donc pas le résultat de la seule somme de ses constituants.**

Pour étudier l'hypothèse de la formation de métabolons, j'ai ainsi développé et mis en œuvre de nouvelles approches pour étudier deux voies de biosynthèse :

- la voie de biosynthèse de la lignine chez *A. thaliana*,
- la voie de biosynthèse de la dhurrine chez une Poacée cultivée, *Sorghum bicolor*.

Ces deux voies de biosynthèse font intervenir des enzymes solubles et des P450s membranaires associés à la membrane du RE. Les enzymes membranaires, comme les P450s, sont supposées avoir un rôle de nucléation des métabolons (Jørgensen et al., 2005; Ralston and Yu, 2006). Ainsi, le métabolon de la lignine et celui de la dhurrine étaient prédits comme associés aux membranes du RE.

Le métabolon de la lignine

Introduction

J'ai étudié certaines enzymes du métabolon de la lignine au cours de mes travaux de master 2 et de thèse à l'IBMP. Tout d'abord durant mon master 2, j'ai cherché à améliorer le processus de production hétérologue d'enzymes impliquées dans cette voie de biosynthèse. J'ai continué ceci au début de ma thèse, pour ensuite étudier les interactions protéine-protéine et les interactions protéine-membrane, principalement via des techniques *in planta*. J'ai participé à des études *in vitro* en fournissant à des partenaires les protéines hétérologues que j'ai produites.

Je vais tout d'abord décrire brièvement l'intérêt de l'étude de la voie de biosynthèse de la lignine et je vais présenter les enzymes qui sont impliquées sur la partie en amont de cette voie, et que je n'ai pas déjà décrites auparavant.

La lignine

La lignine, ou plutôt les lignines, sont des biopolymères structuraux, rigides, résistants et hydrophobes, formés par un maillage complexe de composés produits par la voie des phénylpropanoïdes, et caractéristiques des plantes vasculaires : Trachéophytes (ptéridophytes, gymnospermes et angiospermes). Ces polymères s'accumulent principalement dans la paroi pectocellulosique de cellules ayant un rôle mécanique ou de conduction. Après la cellulose, les lignines représentent la source de carbone la plus abondante sur Terre (Somerville et al., 2004).

Au milieu de l'époque du Silurien, il y a environ 420 Millions d'années, le retrait progressif des océans a poussé les plantes aquatiques à s'adapter à l'environnement terrestre, en modifiant leur appareil reproductif pour faire face au manque d'eau, ainsi qu'à la gravité terrestre. Durant l'évolution, cette transition, du fait de sa complexité structurale et physiologique, est vue comme l'un des événements majeurs de l'histoire des plantes. Pendant des millions d'années, les plantes terrestres

sont restées petites et de formes relativement simples. Ensuite, l'appareil végétatif a évolué pour être plus grand, plus complexe, remplissant des fonctions spécialisées et avec des tissus bien différenciés. L'apparition de la lignine a permis à la plante de rigidifier ses tissus, pour devenir plus grande. Cette évolution a nécessité la formation d'un tissu spécialisé, le système vasculaire, qui permet le transport de l'eau et des nutriments des racines jusqu'aux feuilles à la cime des arbres. Les propriétés conductrices des trachéides (vaisseaux) sont directement liées à la biosynthèse et au dépôt des lignines (Boerjan et al., 2003). Les parois cellulaires imprégnées de lignines (dénommées comme lignifiées) se trouvent autour de toutes les cellules des tissus impliqués dans la rigidification de la plantes (collenchymes) ou pour le transport de l'eau et des minéraux (xylème). Ainsi, la lignine est l'un des biopolymères les plus essentiels à l'évolution des plantes au milieu terrestre. Finalement, les lignines sont aussi des barrières physiques. Le dépôt de lignines et les changements dans leurs compositions contribuent à l'adaptation face aux divers stress abiotiques ou biotiques (Moura et al., 2010).

L'émergence des voies de biosynthèse des monolignols (sous-unités H, S et G de lignine) s'est produite par le recrutement progressif de différentes enzymes du métabolisme primaire, suivi de leur spécialisation. Par exemple, la phénylalanine ammonia-lyase (PAL), la première enzyme de la voie de la lignine, qui convertit la phénylalanine en acide *t*-cinnamique est un homologue de l'histidine ammonia-lyase (HAL). Cette dernière est impliquée dans la dégradation de l'histidine dans le métabolisme primaire. La PAL a gardé une structure et un mécanisme catalytique similaire à la HAL (Xu et al., 2009; Weng and Chapple, 2010). Par ces processus de recrutement, la voie complète de biosynthèse de la lignine est apparue chez les Ptéridophytes.

La lignine a un intérêt économique en particulier pour l'industrie papetière, l'industrie forestière, l'industrie des biocarburants et l'agriculture. En effet, la lignine est le composé ayant le plus fort pouvoir calorifique et est donc recherchée dans le bois de chauffage. Ce polymère permet également la portée mécanique du bois, pour les charpentes, par exemple. Cependant, la présence de lignine est problématique lors de l'utilisation de la biomasse végétale en papeterie, pour la production de biofuels ou pour la qualité des fourrages (Ralph et al., 2004; Vanholme et al., 2008; Simmons et al., 2010). En effet, la lignine n'est pas digérée par les ruminants : diminuer son taux dans les fourrages permettrait d'accroître l'efficacité énergétique de la digestion. De plus, le papier et les biofuels sont principalement fabriqués à partir de fibres cellulosiques, la lignine doit ainsi être éliminée de la matière végétale. Dans ce sens, depuis 80 ans, des modifications de la voie de biosynthèse conduisant à la formation de la lignine ont été tentées et étudiées (Anterola and Lewis, 2002; Zhong and Ye, 2009; Li and Chapple, 2010).

Le segment en amont de la voie des phénylpropanoïdes chez *Arabidopsis thaliana* fut notre modèle au laboratoire pour développer de nouvelles approches permettant l'étude de métabolons qui gouvernent l'allocation du carbone vers la synthèse des différents produits, entre autres les monolignols. Ce segment est essentiel, il débute par la phénylalanine qui subit un certain nombre de modifications au travers d'une voie métabolique relativement complexe, globalement caractérisée du point de vue moléculaire (Figure 4). Il fait intervenir une séquence d'enzymes qui sont pour la plupart solubles, la Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL), la 4-coumarate CoA ligase (4CL) et l'hydroxycinnamoylCoA : shikimate/quinatate hydroxycinnamoyl transférase (HCT)(Lee et al., 1997; Hoffmann et al., 2003). Deux mono-oxygénases qui sont des P450s membranaires (CYP73A5 et CYP98A3 chez *Arabidopsis thaliana* ; Cf. chapitre « du gène à la fonction »), sont également impliquées.

La mobilité restreinte des P450s membranaires a conduit à l'hypothèse selon laquelle ils serviraient d'ancrage à des partenaires solubles pour la formation de métabolons. Divers indices qui confortent l'hypothèse de la formation de métabolons ont été obtenus durant ces quarante dernières années par

des expériences d'incorporation de précurseur radiomarqués, de co-immunoprécipitation, de co-isolation et de colocalisation, par exemple.

Les 4-coumarate CoA Ligases (4CLs)

Les 4-coumarate Coenzyme A ligases sont des enzymes cytosoliques qui catalysent, dépendamment de l'ATP, la formation d'esters de CoA d'acides hydroxycinnamiques. Ces esters jouent un rôle essentiel dans la voie des phénylpropanoïdes en étant à la bifurcation d'un grand nombre de branches, conduisant à la production de lignines, flavonoïdes, stilbènes... (Figure 4).

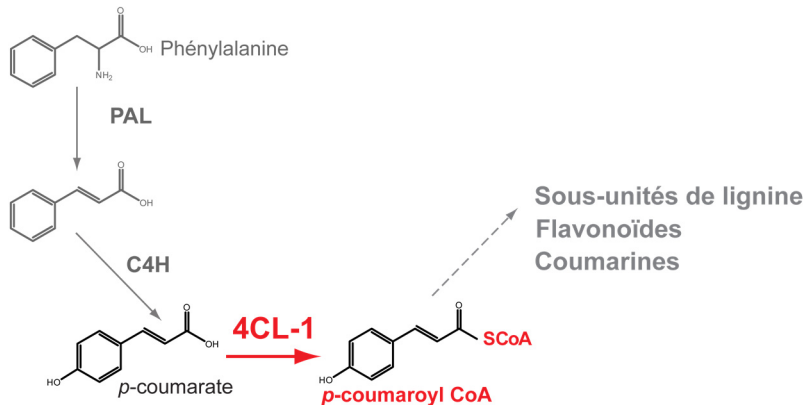


Figure 18. Réaction canonique de la 4-coumarate CoA ligase-1 (4CL-1) dans la voie des phénylpropanoïdes

Dès les années 1980, les 4CLs ont été décrites dans de nombreuses plantes, et selon l'espèce, une ou plusieurs isoformes sont présentes (Xu et al., 2009). L'existence de plusieurs isoformes dans une même plante pourrait suggérer un rôle distinct pour chacune d'entre elles. En effet, ceci fut observé lors de différentes études montrant soit des patrons d'expression différents,

soit l'intervention d'une isoforme particulière dans une branche particulière du métabolisme des phénylpropanoïdes, soit des divergences dans leurs spécificités de substrats (Ehlting et al., 1999; Lindermayr et al., 2002; Hamberger and Hahlbrock, 2004; Soltani et al., 2006). En général, les 4CLs sont exprimées constitutivement dans tous les tissus, mais plus fortement dans les tiges, les racines et les fleurs ; l'expression est également accrue par la blessure, l'élévation et l'infection fongique (Soltani et al., 2006).

Chez *A. thaliana* 4CL-1 semble plus particulièrement impliquée dans la synthèse des monolignols (Figure 18)(Lee et al., 1997; Anterola and Lewis, 2002).

Les Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transférases (HCTs/HQTs)

Les HCTs/HQTs sont des enzymes solubles appartenant à la famille des BAHD acyltransférases (Benzyl alcohol, Anthocyanin, Hydroxycinnamoyl, Diacetylindoline acyltransferases) impliquées dans la biosynthèse de nombreux métabolites spécialisés. Les BAHD acyltransférases catalysent le transfert d'un acyl sur une grande variété de molécules accepteurs, comme des anthocyanes, des flavonols, ou des phénolamides (D'Auria, 2006; D'Auria et al., 2007a, 2007b; Luo et al., 2007; Grienenberger et al., 2009).

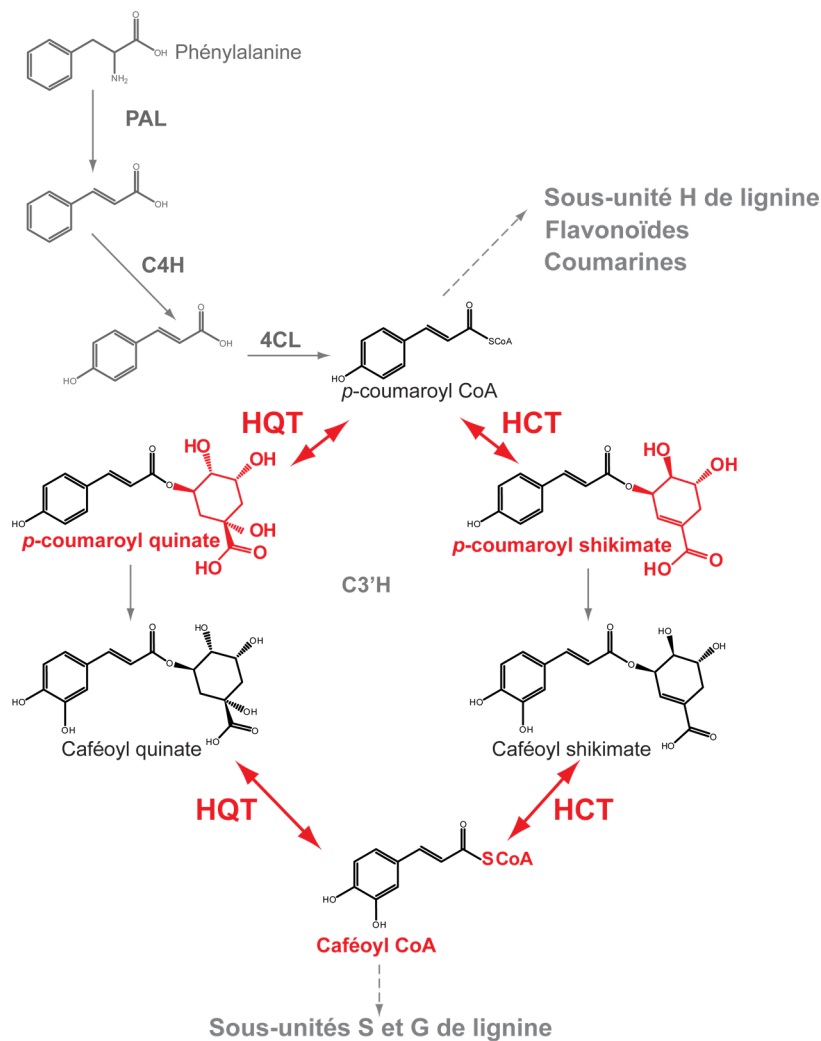


Figure 19. Réactions canoniques des Hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferases (HCT/HQT) dans la voie des phénylpropanoïdes

lignification. L'extinction du gène de l'HCT provoque des modifications dans la composition de la lignine, modifie la structure de la paroi cellulaire et impacte le développement de la plante (Hoffmann et al., 2004), démontrant son rôle dans la biosynthèse de la lignine.

Travaux réalisés

Les objectifs du projet étaient, en utilisant de nouvelles approches technologiques, de prouver que des interactions protéine-protéine se produisent entre quatre enzymes intervenant dans la voie de la lignine et plus particulièrement entre 4CL-1 et CYP73A5, et entre HCT et CYP98A3. L'objectif final était de prouver l'existence d'un métabolite constitué de ces quatre enzymes. Mon projet faisait partie d'un projet plus large, financé par l'organisme Human Frontier (HFSP) et impliquant plusieurs laboratoires associés dans un contexte multinational et multidisciplinaire. Ce projet était divisé en deux parties, l'une basée sur l'utilisation d'approches *in vitro*, et l'autre sur des approches *in vivo*.

Concernant les approches *in vitro*, j'avais été chargé de produire et purifier les P450s (CYP73A5 et CYP98A3) et leurs partenaires solubles potentiels (4CL-1 et HCT). Ces outils biologiques ont ensuite été utilisés par nos partenaires. Dans un premier temps, j'ai dû optimiser les protocoles routiniers d'expression et de purification des différentes enzymes recombinantes. Le but était d'avoir des quantités, qualités et concentrations suffisantes pour satisfaire aux exigences de nos associés, qui ont utilisé ensuite ces outils biologiques.

Les HCTs catalysent la conversion du *p*-coumaroyl-CoA (donneur de groupement acyl) et du shikimate ou quinate (accepteur) en *p*-coumaroyl shikimate ou *p*-coumaroyl quinate (Figure 19)(Hoffmann et al., 2003, 2004). Les HCTs peuvent également catalyser la conversion du caféoyl CoA en caféoyl shikimate ou caféoyl quinate (acide chlorogénique). Les HCTs sont plus actives avec le *p*-coumaroyl-CoA et les esters de caféoyl-CoA comme donneurs d'acyl, mais elles peuvent également faiblement métaboliser le cinnamoyl-CoA, le feruloyl-CoA et le sinapoyl-CoA (Hoffmann et al., 2003).

Comme toutes les acyltransférases, les HCTs peuvent également catalyser les réactions inverses, *i.e.* la formation de caféoyl CoA à partir de caféoyl shikimate.

Les HCTs sont exprimées dans les tissus lignifiés ou en

Concernant les P450s, ils étaient originellement exprimés dans la levure qui offre un contexte membranaire adapté à leur expression. Pour améliorer leurs productions, j'ai testé de nombreuses combinaisons faisant intervenir : différentes souches de levure, l'expression des P450s avec le système baculovirus-cellules d'insecte Sf9, différentes températures durant l'induction de l'expression des P450s, la solubilisation des P450s par différents détergents (Emulgen 911 ou *n*-octylglucoside), l'ajout d'additifs (DTT, PMSF ou β -mercapthoethanol) durant la purification, la concentration sur centricon des P450s purifiés. Deux changements ont donné les meilleurs résultats, ce fut une diminution de la température utilisée durant l'induction de l'expression (de 24°C à 20°C), et l'augmentation de la quantité de protéines totales chargées sur les colonnes de purification. Mais, la solubilisation des P450s était encore à améliorer avec approximativement la moitié des P450s qui perdaient leur conformation fonctionnelle durant cette étape, d'après les spectres CO différentiels. Malgré tout, j'ai pu produire CYP73A5 et CYP98A3 à des concentrations de l'ordre de 18 nmole.L⁻¹ et de 51 nmole.L⁻¹ de culture, respectivement. Après optimisation de la purification, j'ai pu obtenir des P450s fonctionnels à des concentrations de l'ordre de 1 μ mole.mL⁻¹ pour CYP73A5 et de 1,5 μ mole.mL⁻¹ pour CYP98A3. Ainsi, la quantité de P450s pures et fonctionnels après purification a été doublée après optimisation des protocoles. **La pureté des préparations et les quantités des P450s purifiées étaient suffisantes pour nos partenaires.**

Les protéines solubles (4CL-1 et HCT), ne nécessitant pas un environnement membranaire particulier, ont été exprimés dans la bactérie *Escherichia coli*. Pour améliorer la production de ces protéines, j'ai testé de nombreuses combinaisons faisant intervenir : des protéines chaperonnes (DnaK, DnaJ, GroEL, GroES et GrpE), trois souches de bactéries (BL21-(DE3); M15, BL21-(DE3)-G612), quatre températures différentes lors de l'induction de l'expression (18, 20, 24, 37°C), différents temps d'induction de l'expression (1, 2, 4, 6, 15, 20h), diverses concentrations en inducteur (0.1, 0.5, 1, 10, 100 mM), des inductions à différents moments de la croissance bactérienne (0.3 à 1 DO₆₀₀), des cultures à différentes vitesses d'agitation (90 à 170 rpm) donc différents niveaux d'oxygénation, diverses méthodes pour casser les cellules avant purification (choc thermique, sonication, ...), diverses techniques de purification (colonnes commerciales, en « batch », système « hybride »), la concentration sur centricon des protéines purifiées, ou encore une seconde purification des protéines sur une colonne échangeuse d'anion montée sur un système chromatographique liquide moyenne pression. L'amélioration de l'expression des protéines solubles fut plus complexe que prévue. Le paramètre qui parut le plus important était la souche de bactéries utilisée pour l'expression des protéines. Après optimisation de l'expression, j'ai pu obtenir des concentrations en protéine de l'ordre de 12-13 mg.L⁻¹ de culture pour 4CL-1 et de 1 mg.L⁻¹ de culture pour HCT. Après purification, j'ai obtenu des concentrations de l'ordre de 5 mg.mL⁻¹ pour 4CL-1 et 2 mg.mL⁻¹ pour HCT. J'ai amélioré d'un facteur dix la quantité de 4CL-1 exprimée et j'ai multiplié par deux la concentration en 4CL-1 purifiée. Pour HCT, je n'ai pas pu améliorer l'expression, mais j'ai amélioré d'un facteur deux la concentration en protéines obtenues après purification. L'obtention de 4CL-1 plus concentrée (>5-6 mg.mL⁻¹) fut limitée par l'agrégation spontanée de l'enzyme lors des phases de congélation/décongélation entre les différentes étapes de production. **Les concentrations, quantités et qualités obtenues avec 4CL-1 ont été suffisantes. En revanche, les concentrations obtenues avec HCT semblaient encore faibles pour continuer le projet avec les partenaires.**

Nos collaborateurs américains ont incorporé les P450s purifiés dans des nanostructures appelées « nanodisques ». Cette technologie originale permet l'ancrage des P450s membranaires au sein de nanodisques lipidiques de manière à ce qu'ils restent fonctionnels pour des tests d'interaction. Ensuite, nos partenaires danois ont utilisé ces nanodisques pour tenter de piéger les partenaires solubles formant les métabolons et tester les interactions entre P450s et protéines solubles, après greffage des nanodisques sur des puces de Biacore ou par co-immunoprécipitation.

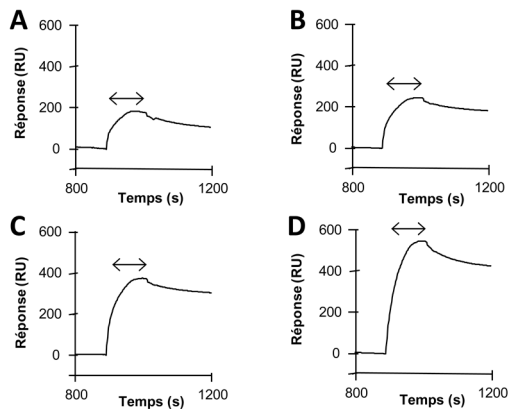


Figure 20. Interaction *in vitro* de 4CL-1 avec des liposomes

Interactions avec des liposomes composés de A) phosphatidylcholine; B) phosphatidylcholine + phosphatidylsérine; C) phosphatidylcholine + phosphatidyléthanolamine, D) asolectin (extrait de soja). RU est une mesure de l'index de réfractivité à la surface du détecteur. La flèche double indique le temps pendant lequel 4CL-1 est injectée. Le tampon, avant, pendant et après injection est le même. La différence de réfractivité est donc liée à l'injection de la protéine qui interagit avec les liposomes immobilisés. Résultats obtenus par Jonas Borch (Odense, Danemark).

susceptibles d'interagir avec les P450s (sous forme de nanodisques fixés sur des puces de Biacore). Mais, **aucun partenaire probant n'a pu être identifié**. Seules des protéines majoritaires comme la Rubisco ont été détectées comme interagissant, sans doute de façon non-spécifique.

Parallèlement à ces études *in vitro*, mon objectif était de tester les interactions protéine-protéine *in planta*. Pour cela, j'ai réalisé une batterie de constructions permettant l'expression dans la plante de protéines fluorescentes en fusion avec les protéines d'intérêt. L'ensemble de ces constructions a été exprimé de façon transitoire dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* pour une analyse par diverses techniques de microscopie confocale. Ce travail a nécessité la mise au point de nouvelles approches techniques, notamment pour quantifier la relocalisation des protéines solubles.

Un point important pour l'étude des interactions protéine-protéine est la fonctionnalité des protéines utilisées lors de l'étude. Il est admis que des protéines d'intérêt pourraient être déstabilisées par leur fusion avec une protéine fluorescente et par conséquent leurs propriétés d'interaction pourraient être modifiées. Dans un premier temps, la fonctionnalité des protéines constituant les protéines de fusion a été vérifiée. Les constructions préparées ont été démontrées comme enzymatiquement actives et la protéine fluorescente reportrice fut également fonctionnelle dans les cellules épidermiques de *N. benthamiana*.

A l'aide de ces outils biologiques, nos partenaires ont pu démontrer *in vitro* que **les enzymes solubles purifiées (la 4CL-1 et l'HCT) ont la capacité d'interagir avec une bicouche lipidique (sous forme de nanodisques ou de liposomes) en absence de P450**. Ceci conforte ce que j'ai pu observer *in vivo* (Cf. paragraphes suivants). De plus, **l'interaction de la 4CL-1 avec les membranes semble dépendante des types de phospholipides constituant cette membrane** (Figure 20). Le mécanisme d'interaction des protéines solubles vis-à-vis des membranes n'a pas été étudié. **L'interaction de 4CL-1 avec les P450s (CYP98A3 et CYP73A5) fut démontrée** par co-immunoprécipitation. En revanche, aucune interaction n'a été observée entre HCT et les P450s, peut-être à cause des concentrations relativement faibles des préparations d'HCT.

Parallèlement à la préparation de protéines solubles purifiées, j'ai également préparé différents extraits bruts d'*Arabidopsis thaliana*, pour tenter de lier et d'identifier directement d'éventuelles protéines partenaires

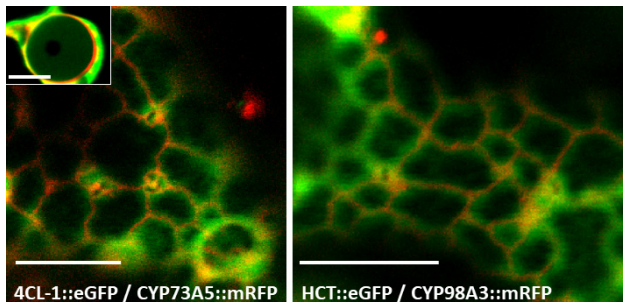


Figure 22. Fluorescence enregistrée au microscope confocal après co-expression des enzymes solubles et de leur P450 partenaire fusionnés à des protéines fluorescentes

Les images des deux canaux utilisés pour l'acquisition des fluorescences de la eGFP et de la mRFP ont été fusionnées. L'encart à gauche est un zoom sur le noyau. Les deux images principales montrent le réseau réticulé du RE avec le cytoplasme qui l'entoure. La Latrunculin B (20 μ M) fut ajoutée avant l'acquisition des images pour limiter le remodelage du RE. Barre d'échelle : 10 μ m.

La localisation subcellulaire de chacune des protéines fut également correcte, en effet, les P450s étaient associés avec le RE et les protéines 4CL-1 et HCT étaient solubles. J'ai ensuite entrepris des expériences de colocalisation entre les différents partenaires supposés (Figure 22). J'ai également cherché à observer la relocalisation des protéines solubles, en présence des P450s appropriés et sous l'action de différentes combinaisons de substrats et cofacteurs de ces enzymes. Une méthode a été mise au point pour quantifier cette relocalisation. Cette méthode est basée sur la mesure de la répartition des constructions

fluorescentes dans un volume tridimensionnel autour des membranes du RE (Figure 21). Elle permet de comparer les différentes conditions provoquant une relocalisation, elle n'est pas impactée par les mouvements des composants cellulaires et elle paraît robuste, efficace et simple à mettre en place.

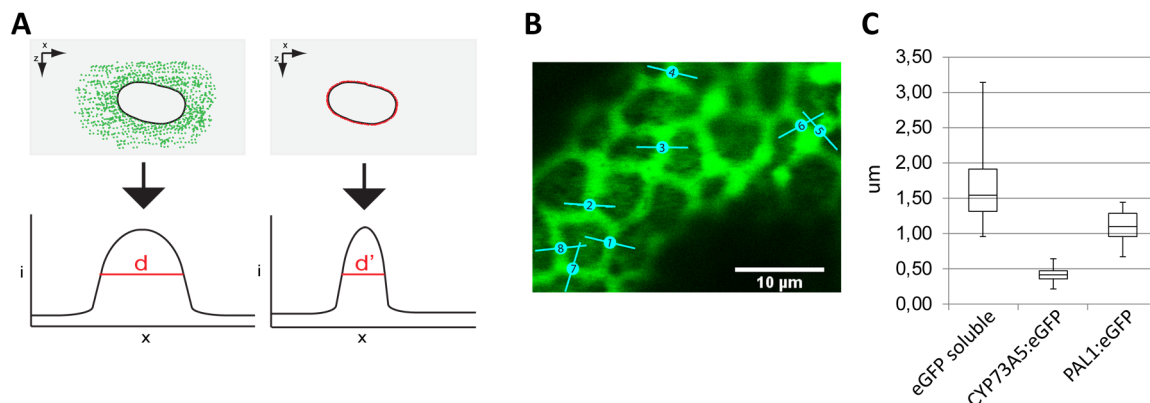


Figure 21. Mesure de la localisation subcellulaire des protéines cibles à partir d'images de microscopie confocale

A. Représentations schématiques de coupes transversales d'un tubule du RE avec la distribution hypothétique d'une GFP soluble (à gauche) et d'une RFP membranaire (à droite) avec calcul des courbes de Gauss correspondantes, fonction de la distance (x) et de l'intensité (i) de la fluorescence. d et d' représentent la largeur à mi-hauteur des courbes de Gauss respectives.

B. Exemple d'image confocale d'une protéine soluble avec des points de mesure utilisés pour déterminer les courbes de Gauss et leur largeur à mi-hauteur.

C. Exemple de résultats obtenus avec une eGFP soluble, un P450 membranaire (CYP73A5) et une enzyme soluble décrite dans la littérature comme s'associant aux membranes du RE (PAL1).

Une relocalisation des protéines solubles lors de l'expression des partenaires P450s fut observée, ainsi l'existence d'interactions protéine-protéine entre les P450s et les protéines solubles cibles est probable. Ceci fut vérifié en mesurant le Fluorescence/Föster Resonance Energy Transfer (FRET) entre les protéines fluorescentes reportrices par la technique de Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM ; Figure 23).

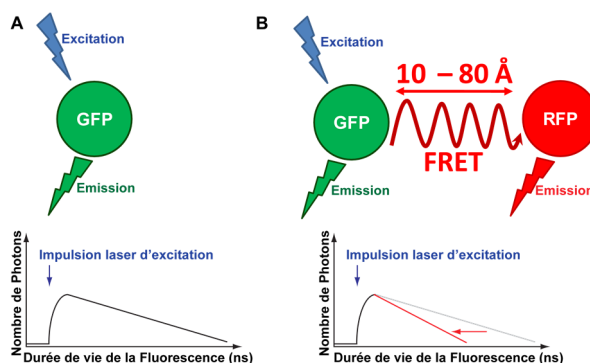


Figure 23. Principe du FRET/FLIM

A. GFP exprimée seule ou avec une RFP trop éloignée pour qu'un transfert d'énergie se produise.

B. GFP coexprimée avec une RFP, assez proche, pour qu'un transfert d'énergie se produise et conduise à une diminution de la durée de vie de la fluorescence de la GFP.

GFP : donneur d'énergie ; RFP : accepteur d'énergie ; ns : nanoseconde.

Finalement, la mobilité subcellulaire des protéines d'intérêt fut mesurée dans les cellules épidermiques de *N. benthamiana* par Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP).

En plus de ces approches *in planta* utilisant des techniques de microscopie confocale, j'avais également entrepris des expériences utilisant les techniques de « cross-linking », de co-immunoprécipitation et d'électrophorèse en condition native (BN-PAGE) sur des extraits bruts ou sur des fractions microsomales d'*A. thaliana*. Une expérience de TAP-tag (Tandem Affinity Purification) fut également réalisée par un associé. L'ensemble de ces expériences avaient pour objectifs de confirmer les interactions entre P450 et enzymes solubles et également d'identifier des protéines, connues ou non connues, pouvant être d'autres partenaires des enzymes cibles au sein du métabolon.

L'ensemble des résultats obtenus lors de ce projet peuvent se résumer de la manière suivante :

- CYP73A5 et CYP98A3 sont localisés au niveau du RE,
- Le RE des cellules de plante est extrêmement mobile, ce qui rend l'ensemble du système extrêmement dynamique,
- Les P450s liés aux membranes du RE semblent retenus par des éléments cellulaires non déterminés, d'après les données obtenues avec la technique de FRAP,
- Nous avons montré par TAP-tag que les deux P450s sont associés à des protéines résidentes du RE, comme les réticulons, des Membrane Steroid Binding Protein (MSBP), Sterol C24-Methyl Transferase (SMT), band7 protein, synaptotagmin (SYTA), ... La plupart de ces protéines sont décrites comme impliquées dans l'homéostasie de la membrane du RE ou dans la structuration du RE,
- Les protéines solubles sont localisées dans le cytoplasme, mais sont concentrées localement à la périphérie du RE, même en l'absence d'une co-expression des P450s partenaires. L'HCT est beaucoup plus proche des membranes du RE que la 4CL-1. Le mécanisme conditionnant cette localisation n'a pas été étudié,
- J'ai pu observer une relocalisation partielle au niveau du RE de 4CL-1, mais plus spectaculairement de l'HCT, en présence de CYP73A5 et/ou de CYP98A3,
- CYP98A3 avait un effet plus marqué que CYP73A5 sur la relocalisation de 4CL-1 et de l'HCT. Ceci laisse supposer un rôle clé de CYP98A3 dans la formation du métabolon de la lignine,
- Une homo-oligomérisation ainsi qu'une hétéro-oligomérisation des deux P450s ont été observées,
- L'interaction d'un couple P450-enzyme soluble est renforcée par l'expression de l'autre couple. De plus l'interaction entre enzymes non consécutives dans la voie de biosynthèse (CYP98A3 avec 4CL-1, par exemple) a été détectée et favorisée lors de la co-expression de l'ensemble des partenaires. Ceci suggère fortement la formation d'un métabolon,
- Dans les cellules où visuellement la relocalisation des deux enzymes solubles se produit, il est possible de détecter, à la surface du RE, l'interaction des deux enzymes solubles entre elles,
- L'application d'un stress blessure sur les feuilles de *N. benthamiana*, trois heures avant observation au microscope, induit une relocalisation plus massive des protéines solubles, et dans certains cas (interaction 4CL-1/HCT) augmente significativement les valeurs de FRET.

Finalement, les interactions protéine-protéine n'ont parfois été détectées qu'au moment de la co-expression de l'ensemble des quatre partenaires. Ce qui est sans doute un point critique pour détecter la formation des métabolons, qui sont des complexes transitoires et fragiles.

Conclusion

Tous ces résultats suggèrent la formation d'un complexe supramoléculaire auquel participent les quatre enzymes, solubles ou membranaires. La formation du métabolon est peut-être favorisée par la forte mobilité du RE et des P450s sur celui-ci, ainsi que par la proximité des enzymes solubles avec

la membrane du RE. La dimérisation des deux P450s peut offrir une assise plus importante pour le métabolisme et la réductase indispensable au fonctionnement des P450s peut également avoir un rôle. Ces données mettent en évidence un modèle de métabolisme végétal extrêmement dynamique, avec des enzymes solubles et membranaires qui sont associées au très versatile réseau endoplasmique.

Bilan

Ces travaux ont été valorisés dans deux publications :

- **J-E Bassard**, L Richert, J Geerinck, H Renault, F Duval, P Ullmann, M Schmitt, E Meyer, J Mutterer, W Boerjan, G De Jaeger, Y Mely, A Goossens and D Werck-Reichhart (2012) *Plant Cell* 24(11): 4465-4482,
- **J-E Bassard**, J Mutterer, F Duval, D Werck-Reichhart (2012) *FEBS journal* 279(9): 1576-1584.

J'ai également exposé ces résultats lors de cinq conférences sous forme de posters ou de présentations orales : au 9th International symposium on Cytochromes P450 Biodiversity and Biotechnology ; au FEBS Advanced course: cytochromes P450 System ; au 8^{ème} Colloque national de la Société Française de Biologie Végétale ; au 8th Plant GEM meeting ; au 1st Working on Walls meeting.

Ce projet qui représente la majeure partie de mon travail de thèse a été réalisé grâce au soutien de l'organisme « Human Frontier of Science Program » dans un contexte partenarial multinational et multidisciplinaire ce qui m'a permis d'élargir mon réseau scientifique.

Le métabolisme de la dhurrine

Introduction

La lignine est une molécule essentielle dans la vie de la plante mais pas forcément représentative de tous les métabolismes spécialisés. Pour compléter l'étude des métabolismes, je me suis orienté vers l'étude d'une autre voie de biosynthèse du métabolisme spécialisé, impliquée entre autres dans la défense des plantes, et conduisant à la biosynthèse de la dhurrine. J'ai étudié les enzymes du métabolisme de la dhurrine au cours de mon postdoctorat à l'Université de Copenhague.

Je vais tout d'abord décrire brièvement l'intérêt de l'étude de la voie de la dhurrine et les spécificités de sa biosynthèse et du stockage de cette molécule et de ces intermédiaires.

La dhurrine est une molécule de la classe des glucosides cyanogéniques, produite par la céréale *Sorghum bicolor* (Sorgho). La dhurrine a de nombreuses fonctions physiologiques durant le cycle de vie de *S. bicolor*. Cette molécule est surproduite dans des plantes soumises à des conditions de sécheresse ou de froid extrême et elle est toxique pour les animaux ou l'Homme qui la consomment. La dhurrine fait partie d'un système de défense à deux composants (la Dhurrine et des β -glucosidases nommées Dhurrinases), qui protègent la plante contre les attaques d'herbivores en libérant du cyanure d'hydrogène (HCN) par hydrolyse de la dhurrine, lorsque les tissus sont brisés. La dhurrine sert aussi de stockage de sucre et de forme réduite d'azote, qui peuvent être recyclés pour le métabolisme primaire (Pičmanová et al., 2015; Bjarnholt et al., 2018).

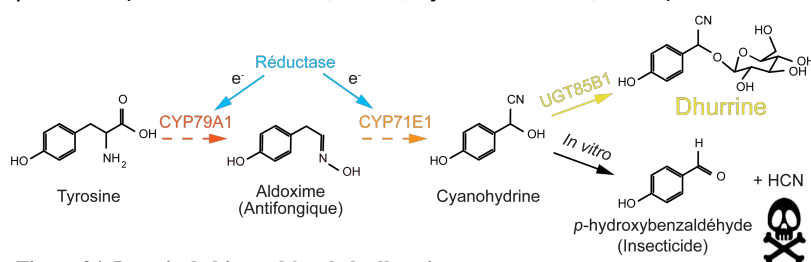


Figure 24. La voie de biosynthèse de la dhurrine

CYP79A1 et CYP71E1 sont des P450s localisés à la surface de la membrane du RE. UGT85B1 est une glycosyltransférase cytosolique. La cyanohydrine se dégrade spontanément. HCN: cyanure d'hydrogène.

La voie de biosynthèse de la dhurrine est caractérisée et fait intervenir deux P450s (CYP79A1 et CYP71E1, localisés à la surface du RE, et une glycosyltransférase (UGT85B1) qui est une enzyme soluble (Figure 24) (Sibbesen et al., 1994; Bak et al., 1998; Jones

et al., 1999). Pour leur fonctionnement, les P450s ont besoin d'électrons qui sont fournis par une oxydoréductase de P450 (POR). Les intermédiaires de cette voie métabolique sont très réactifs et toxiques.

Pour stabiliser les aglycones toxiques ou labiles dans les cellules, et/ou permettre d'augmenter la solubilité des aglycones hydrophobes, généralement ces métabolites spécialisés sont glycosylés par la cellule (Gachon et al., 2005). La structure de la dhurrine est constituée d'un groupement *para*-OH libre qui, malgré la glycosylation du groupe fonctionnel cyanohydrine, rend la dhurrine labile comparée à d'autres glucosides cyanogéniques (Møller et al., 2016; Bjarnholt et al., 2018). Paradoxalement, la dhurrine représente jusqu'à 30% du poids sec des jeunes pousses de *S. bicolor* (Halkier and Moller, 1989), même si les enzymes de la voie ne représentent que 1% des protéines (Sibbesen et al., 1994). La dhurrine est donc une bombe imposante et encombrante dans les cellules qui la produisent.

Depuis plusieurs décennies, il est suggéré que la dhurrine est stockée dans la vacuole, comme beaucoup de métabolites spécialisés glycosylés (Saunders and Conn, 1978; Morant et al., 2008; Zhang et al., 2015). Mais une étude récente challenge cette idée, et montre que la dhurrine serait plutôt stockée dans l'apoplaste et/ou dans le cytoplasme (Heraud et al., 2018). Une localisation de la dhurrine dans le cytoplasme ou l'apoplaste pose de nombreuses questions concernant la possible hydrolyse immédiate de la dhurrine dans ces compartiments cellulaires. La dhurrine n'est en effet pas stable dans un milieu à pH élevé comme le cytoplasme, et l'environnement de l'apoplaste devrait également provoquer l'hydrolyse (Møller et al., 2016). Au pH cytoplasmique, la dhurrine devrait également réagir chimiquement avec le glutathion fortement concentré dans cet environnement (Meyer et al., 2001; Hartmann et al., 2003; Bjarnholt et al., 2018). Les autres composants du système double de défense, les dhurrinases, ont été démontrés comme étant localisés dans les plastes (Kojima et al., 1979; Thayer and Conn, 1981; Hösel et al., 1987).

De par la toxicité des intermédiaires métaboliques, de la grande quantité de dhurrine produite et stockée, de la faible concentration en enzymes de la voie et de diverses expériences montrant la canalisation des intermédiaires métaboliques, il a été suggéré qu'un métabolite se formait dans cette voie de biosynthèse (Møller and Conn, 1980; Halkier and Moller, 1989; Bak et al., 1999; Tattersall et al., 2001; Kristensen et al., 2005). L'assemblage combinatoire et contrôlé du métabolite de la dhurrine, permettrait à la cellule de produire différentes molécules de défense (Figure 24)(la dhurrine ; l'aldoxime un fongicide ; ou la cyanohydrine converti *in vitro* en insecticide) de façon efficace et économe, sans avoir besoin de synthétiser de nouvelles protéines. La formation d'un métabolite permettrait aussi une utilisation efficace du précurseur Tyrosine et une canalisation des intermédiaires toxiques et labiles jusqu'au produit final (Møller and Conn, 1980).

De plus, la dhurrine ainsi que les dhurrinases seraient peut-être stockées dans des microenvironnements uniques et spécifiques ayant un fort pouvoir de solubilisation et qui éviteraient l'hydrolyse non-contrôlée de la dhurrine. La nature exacte de ces microenvironnements et du solvant en question n'est pas connue, mais il fut suggéré que des Solvants Naturels Eutétiques (Natural Deep Eutetic Solvents, NADES) pourraient être impliqués dans la solubilisation de métabolites spécialisés (Choi et al., 2011; González et al., 2018). Les NADES représentent une troisième phase liquide dans les cellules, en plus de la phase aqueuse et de la phase lipidique. Dans les êtres vivants, quelques molécules simples s'accumulent à de très fortes concentrations. Celles-ci incluent des sucres, des acides organiques, la choline et quelques acides aminés. Lorsque ces molécules sont mélangées à des ratios molaires précis et en absence d'eau, ces molécules, chacune solide à température ambiante, se transforment en un liquide visqueux une fois mélangées (Choi et al., 2011). Les NADES furent démontrés comme d'excellents solvants de métabolites spécialisées, comme les flavonoïdes, anthocyanines et la vanilline (Dai et al., 2013, 2014, 2016; González et al., 2018). L'effet

d'encombrement moléculaire dans les cellules est connu comme facilitant les séparations de phases liquide-liquide intracellulaires, en formant des micro-compartiments sans membrane. Les NADES pourraient ainsi participer à la formation de ces micro-compartiments en solubilisant les métabolites spécialisés à l'intérieur de ceux-ci. Il est intéressant de noter que les constituants des NADES, glucose, saccharose, acide malique, acide citrique, s'accumulent fortement dans *S. bicolor* lors de sécheresse (Pavli et al., 2013), et la formation de NADES permettrait aussi d'éviter la perte d'eau durant la sécheresse (Choi et al., 2011).

Travaux réalisés

Afin de démontrer le dynamisme des enzymes composant le métabolon de la dhurrine et l'association de l'ensemble des partenaires, en plus des méthodes développées dans le cadre de ma thèse (Cf. paragraphes précédents), nous avons utilisé des approches *in vitro* où les P450s étaient immobilisés sur des liposomes, des approches de Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS), et nous avons développé un protocole pour l'isolation de métabolons contenant des P450s et leur réductase en utilisant un polymère (copolymère de styrène et d'acide maléique ; SMALPs) (Figure 25) (Dörr et al., 2014; Lee et al., 2016; Stroud et al., 2018) pour leur étude, par exemple, en spectrométrie de masse.

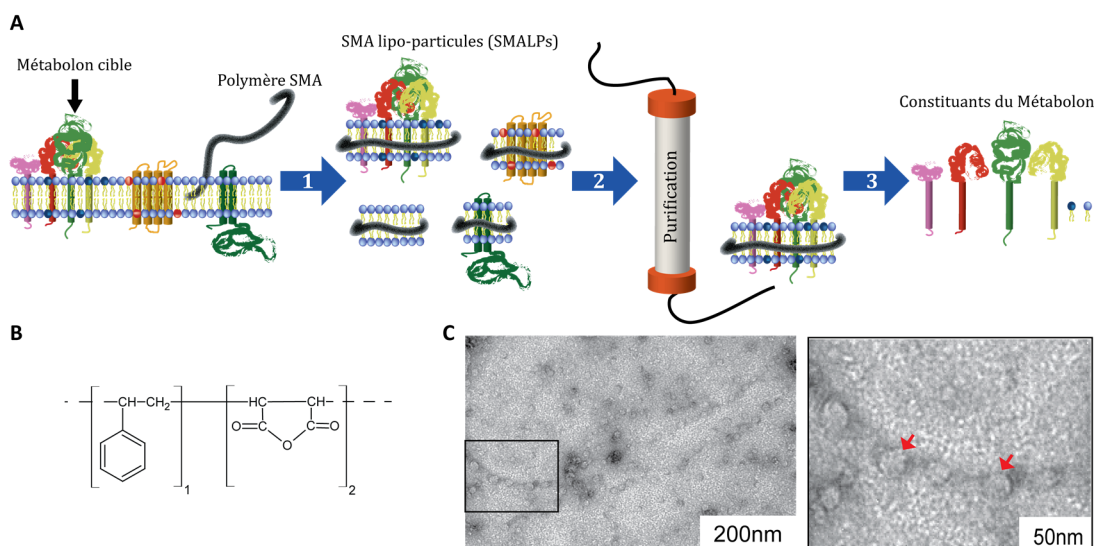


Figure 25. Les SMA lipo-particules (SMALPs)

A. Stratégie pour l'isolation et la caractérisation de métabolons formés de P450s, par utilisation d'un polymère de styrène et d'acide maléique. (1) Le polymère de styrène et d'acide maléique est ajouté à une préparation de membrane (*e.g.* microsomes) et forme spontanément un mélange hétérogène de SMALPs (Styren Maleic Acid Lipo-Particles), qui sont des morceaux de membrane, et de protéines associées, contenus par le polymère. (2) Ce mélange hétérogène est purifié par chromatographie d'affinité (*i.e.* de la POR vis-à-vis de la 2',5'-ADP-sépharose ou l'affinité d'une autre protéine préalablement taguée) pour isoler les SMALPs contenant le métabolon cible. (3) Les constituants (protéines, lipides) du métabolon sont déterminés par des techniques de spectrométrie de masse, par exemple.

B. Formule chimique du polymère SMA. Le polymère SMA utilisé (SMA2000) est un copolymère de faible poids moléculaire de styrène et d'acide maléique avec un ratio de 2:1 mole de styrène : acide maléique. Ce polymère acheté sous forme de maléique anhydre est rendu amphiphile, avant utilisation, par hydrolyse en acide maléique hydrophilique.

C. Image en microscopie électronique à transmission de SMALPs purifiés et négativement colorés. Les flèches pointent sur des SMALPs.

En analysant la composition protéique des métabolons isolés dans les SMALPs, nous avons démontré que certaines protéines du RE, impliquées dans l'homéostasie de la membrane et dans la structure du RE, sont associées avec la POR et les P450s de la Dhurrine. Nous avons aussi observé, un fort déséquilibre stœchiométrique entre les P450s et la POR dans les échantillons de *S. bicolor* (ratio de 15:1). Un tel déséquilibre avait déjà été observé dans d'autres organismes, avec des ratios de 5:1 à 40:1 (Estabrook et al., 1971; Shephard et al., 1983; Watanabe et al., 1993). Sachant que lors

transfert d'électrons entre la POR et les P450s, le transfert implique une interaction entre une seule POR et un seul P450, ceci conduit donc à une compétition des P450s vis-à-vis de l'accessibilité de la POR et des électrons. Ainsi, une régulation fine et l'association dynamique et transitoire des P450s et des PORs est une condition obligatoire pour le bon fonctionnement du métabolisme. Ceci peut être aussi un point de régulation pour la cellule, en contrôlant l'accès, donc l'activité des P450s.

Dans un système *in vitro*, l'UGT85B1, même inactive (sans UDP-Glucose, son co-substrat), accroît l'activité catalytique du CYP79A1, le premier P450 de la voie et un partenaire non-direct, et accroît la canalisation de l'aldoxime entre les deux P450s. Ainsi, la présence de l'UGT85B1 semble réguler le flux de tyrosine le précurseur de la voie, et représente un garde-fou pour éviter de produire des intermédiaires métaboliques toxiques pour la cellule. Ces études *in vitro*, nous ont aussi permis de montrer que la charge globale de la membrane lipidique impacte fortement l'activité du CYP71E1, mais pas celle du CYP79A1. En analysant par spectrométrie de masse la composition lipidique des métabolons isolés dans les SMALPs, certains lipides chargés négativement (phosphatidylglycérol, phosphatidylsérine et phosphatidylinositol) semblent spécifiquement associés au métabolite de la dhurrine. C'est peut-être également une manière pour la cellule de contrôler l'activité des P450s, en contrôlant leur environnement.

En réalisant des profils métaboliques, nous avons noté que lorsque la voie de biosynthèse est reconstituée dans *N. benthamiana*, les intermédiaires de la voie sont extrêmement bien canalisés une fois que les trois enzymes sont coexprimées. J'ai démontré par microscopie confocale quantitative que, contrairement à ce qui avait pu être observé pour les enzymes solubles du métabolite de la lignine, la protéine soluble du métabolite dhurrine, seule, n'avait pas d'affinité pour les membranes *in planta*. D'après les données obtenues avec la technique FRET-FLIM, toutes les enzymes de la voie homo- et hétéro-oligomérisent *in planta*. Mais contrairement au métabolite de la lignine, l'expression des P450s de la dhurrine ne relocalise pas l'enzyme soluble, dans ce cas l'UGT85B1. En revanche, il fut intéressant de noter une forte proximité supramoléculaire entre l'UGT85B1 et la POR, seulement lorsque les P450s partenaires sont coexprimés.

En suivant la dynamique de l'ensemble de ces enzymes par FCS dans *N. benthamiana*, nous avons noté qu'une fois coexprimées toutes ensemble, le coefficient de diffusion moyen de ces enzymes est significativement plus faible que lorsqu'elles sont exprimées seules. Ceci indique qu'elles forment un complexe qui, du fait de sa taille, se déplace moins vite à la surface du RE.

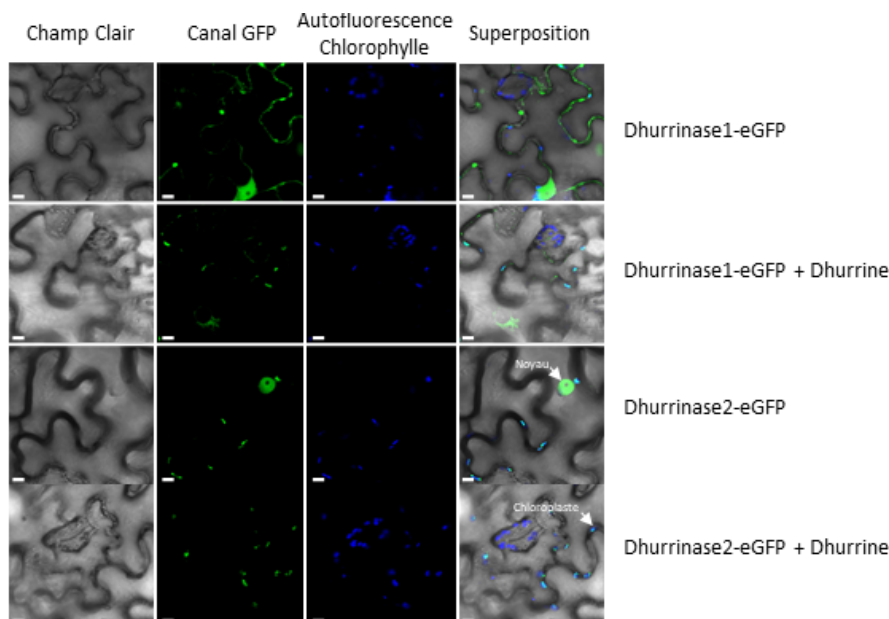


Figure 26. Localisation subcellulaire des fusions dhurrinase-eGFP exprimées transitoirement dans *N. benthamiana*

Les cellules épidermiques ont été observées au microscope confocal 4 jours après infiltration. Les dhurrinases ont été exprimées seule ou coexprimées avec la voie de biosynthèse de la Dhurrine (CYP79A1, CYP71E1, UGT85B1). L'autofluorescence de la chlorophylle est utilisée pour visualiser les chloroplastes. Barre d'échelle = 10 µm.

Par MALDI-MS-imaging nous avons observé que chez *S. bicolor* des constituants de NADES et la dhurrine sont colocalisés dans les plastes et le cytoplasme, comme suggéré par Heraud et al., 2018. Par microscopie confocale, nous avons confirmé la localisation principalement plastidiale des dhurrinases exprimées de manière hétérologue dans *N. benthamiana* (Figure 26). Mais, nous avons également observé une transition de cette localisation subcellulaire du cytoplasme aux chloroplastes au cours du temps (entre 3 à 5 jours après infiltration des feuilles de *N. benthamiana*). Cette transition est plus rapide lors de la co-expression de la voie de biosynthèse de la dhurrine. Ainsi, la dhurrine peut en théorie être en contact des dhurrinases dans le cytoplasme et les plastes, ce qui serait potentiellement toxique pour la cellule produisant la dhurrine.

Nous avons aussi observé que la co-solubilisation de la dhurrine et des dhurrinases dans les NADES empêche l'hydrolyse de la dhurrine (Figure 27). Ainsi, **la dhurrine pourrait être stockée dans les plastes et le cytoplasme avec les dhurrinases, de façon sûre, dans des microenvironnements faisant intervenir des NADES.**

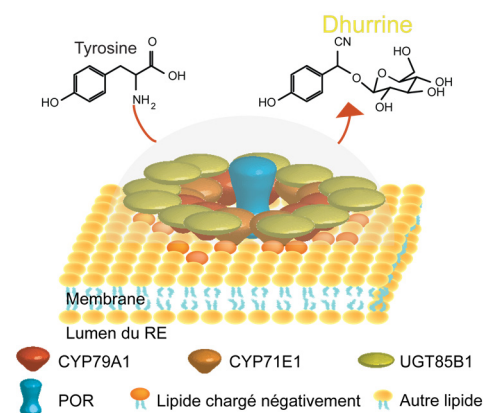
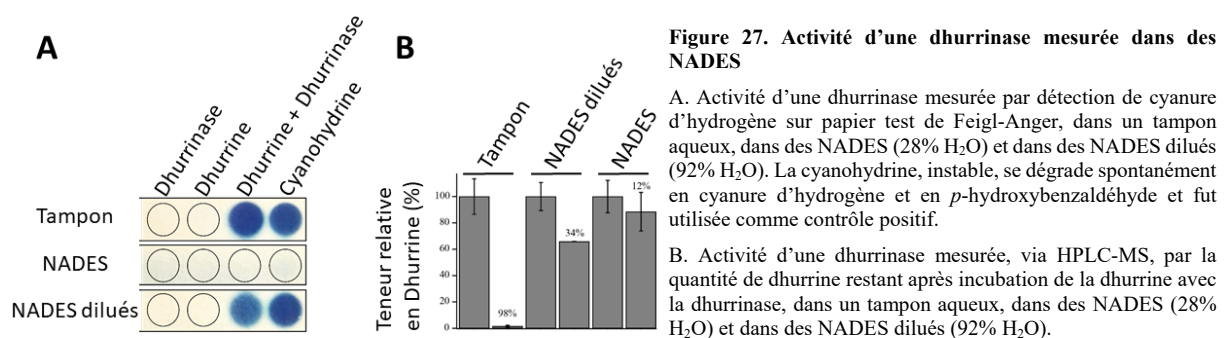


Figure 28. Schéma représentant le métabolisme de la Dhurrine

Bilan

Ces travaux sont valorisés par six publications :

- C Knudsen, L Montini, **J-E Bassard**, KM Viborg, K Jørgensen, C Janfelt, BL Møller, N Bjarnholt, T Laursen (en préparation pour *Plant Physiology*),
- **J-E Bassard*** and Tomas Laursen* (2019) *Methods in enzymology* Volume Metabolons and Supramolecular Enzymes Assemblies, 617: 1-27 *auteurs correspondants,
- **J-E Bassard***, BA Halkier (2018) *Phytochemistry reviews* 17: 211-227. *auteur correspondant,
- **J-E Bassard**, T Laursen, BL Møller (2017) *Current Molecular Biology Reports* 3: 37-51,
- T Laursen, J Borch, C Knudsen, K Bavishi, F Torta, HJ Martens, D Silvestro, NS Hatzakis, MR Wenk, TR Dafforn, CE Olsen, MS Motawia, BR Hamberger, BL Møller*, **J-E Bassard*** (2016) *Science* 354: 890-893, * auteurs correspondants,

- T Laursen, BL Møller, J-E Bassard (2015) *Trends in Plant Science* 20(1): 20-32.

J'ai également présenté ces résultats lors de trois conférences en tant qu'orateur invité : au 13th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology ; au 7^{ième} colloque national Méta-SP ; au Synthetic Biology for Natural Products Conference.

Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de deux projets multidisciplinaires, le "Research center for Plant Plasticity" financé par la fondation VILLUM, et le "Center for Synthetic Biology - bioSYnergy" financé par le programme d'excellence pour des recherches interdisciplinaires de l'Université de Copenhague.

J'ai **participé à la rédaction du projet** « Plant Plasticity » et j'ai été **co-investigateur principal** en charge d'étudier la plasticité des plantes à l'échelle supramoléculaire, c'est-à-dire la formation dynamique de métabolons. Dans ce projet, en plus de mes travaux, j'ai **supervisé les approches *in vitro* qui ont été menées par deux doctorants**.

Conclusion

Les approches non-ciblées mises en œuvre dans les deux études montrent la présence de certaines protéines non-catalytiques communes (réticulons, cytochrome P450 oxydoréductases, cytochromes *b5*, par exemple), associées aux métabolons impliquant des P450s. Cela dit, ces résultats suggèrent également que différents facteurs sont mis en jeu dans la formation des métabolons. L'environnement du métabolon semble essentiel à l'activité de celui-ci en plus de l'homo- et l'hétéro-oligomérisation des enzymes et de la canalisation extrêmement efficace des intermédiaires métaboliques.

Ces métabolons semblent être un nouveau niveau de régulation des métabolismes. Ainsi, ils permettent à la plante, ou la cellule, de produire un profil différent de métabolites, sans avoir besoin de produire de nouvelles protéines, cela en changeant la combinaison des enzymes, et en contrôlant quelles sont les enzymes actives à un instant et un endroit donné.

L'ensemble des compétences et connaissances acquises au début de ma carrière sont mobilisées maintenant pour développer mon projet de recherche actuel que je présente dans le chapitre suivant et qui consiste à poursuivre l'étude de métabolons.

" Le succès n'est pas final. L'échec n'est pas fatal. C'est le courage de continuer qui compte "

Winston Churchill

Chapitre 4 : Rôle des métabolons dans la régulation et la plasticité du métabolisme végétal - Projet de recherche actuel et perspectives

Synopsis

Les différentes études réalisées durant la première partie de ma carrière mettent en exergue la complexité du métabolisme spécialisé et contribuent à démontrer la formation de métabolons dynamiques chez les végétaux. Au cours de cette première étape, mes efforts se sont concentrés sur la démonstration de l'existence des métabolons dans différentes voies métaboliques. Il me paraît maintenant essentiel d'analyser de façon plus approfondie les modalités et le contexte qui gouvernent la formation de ces métabolons, leur organisation, et leur importance dans la régulation et la flexibilité du métabolisme des plantes.

Contexte et enjeux de mon projet

Comme nous avons pu le voir dans les chapitres précédents, la compréhension du métabolisme végétal est un enjeu fondamental pour mieux appréhender l'étude du développement, de la reproduction et de la défense des plantes contre les agressions environnementales. La majorité des molécules naturelles utilisées par l'Homme est issue de plantes (colorants, arômes, parfums, nutraceutiques, médicaments...). La compréhension du métabolisme végétal est donc également essentielle pour de nombreuses applications industrielles.

Un nombre croissant d'études indépendantes démontrent indirectement une organisation supramoléculaire des enzymes de diverses voies métaboliques en complexes enzymatiques, appelés métabolons (Winkel, 2004; Jørgensen et al., 2005; Lallemand et al., 2013; Kwiatkowska et al., 2015; Luu et al., 2015) qui permettent éventuellement un niveau additionnel de régulation des métabolismes. Cependant, **les données collectées concernant l'organisation des métabolons restent parcellaires. Les mécanismes mis en jeu dans la formation des métabolons et leur impact sur le métabolisme ne sont généralement pas abordés.**

Le métabolon : définition et propriétés

Le terme « métabolon », introduit il y a 40 ans, a vu sa définition progressivement évoluer (Stafford, 1974; Srere, 1987; Winkel, 2004; Møller, 2010; Dastmalchi and Facchini, 2016; Laursen et al., 2016). Aujourd'hui, il est communément admis qu'*un métabolon est une organisation supramoléculaire, dynamique et transitoire, d'enzymes partenaires, qui sont souvent consécutives dans une voie de biosynthèse et qui sont associées à des éléments structuraux de la cellule (i.e. membrane, cytosquelette) ainsi qu'à des protéines non-catalytiques. Les protéines constituant un métabolon peuvent être spécifiques à un seul métabolon ou dynamiquement partagées avec d'autres métabolons pour une adaptation agile du profil de molécules synthétisées face aux conditions environnementales et aux besoins cellulaires.*

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent, un grand nombre de voies de biosynthèse, dans l'ensemble des règnes vivants, semblent être organisées sous forme de métabolons. Dans le cas de voies de biosynthèse où des enzymes, comme les P450s, sont associées à des membranes spécifiques, les métabolons sont également associés à ces membranes (Jørgensen et al., 2005; Ralston and Yu, 2006).

La compartimentation supramoléculaire, résultant de la formation du métabolon, permet en théorie d'optimiser les concentrations locales en enzymes et substrats. Les éléments du métabolon interagissent entre eux par des interactions protéine-protéine ou protéine-membrane généralement faibles pour permettre une certaine flexibilité. Du fait de leur nature transitoire, les métabolons sont

difficiles à isoler. Les interactions peuvent altérer les propriétés catalytiques des enzymes et permettre la canalisation des intermédiaires métaboliques (Srere, 1987; Laursen et al., 2016).

Cette canalisation des intermédiaires métaboliques permet de séquestrer les intermédiaires toxiques ou labiles, d'isoler les voies de biosynthèse en compétition pour les mêmes substrats, de limiter l'action de molécules inhibitrices, et permet en théorie de coordonner les interconnexions entre plusieurs voies de biosynthèse (Srere, 1987).

Éléments en faveur de l'existence des métabolons et questions en suspens

Si l'hypothèse de formation de métabolons a été proposée il y a plus de 40 ans, comme nous l'avons vu précédemment, seules des preuves indirectes ont pu établir leur existence.

Ces approches démontrent notamment :

- une homo- et hétéro-oligomérisation des enzymes constituant un métabolon (Chen et al., 2011; Bassard et al., 2012; Reed and Backes, 2016; Laursen et al., 2016),
- une association d'enzymes « solubles » aux membranes (Achnine et al., 2004; Bassard et al., 2012),
- un rôle des ancrs membranaires dans l'interaction des enzymes membranaires (Szczena-Skorupa and Kemper, 2006),
- un effet de lipides membranaires sur des enzymes constituant un métabolon (Das and Sligar, 2009; Brignac-Huber et al., 2016; Laursen et al., 2016),
- la mobilité des constituants du métabolon (Kyoung et al., 2015; Laursen et al., 2016),
- l'inductibilité de leur formation (Bassard et al., 2012; Kyoung et al., 2015).

Certaines études ont suggéré l'existence d'éléments cellulaires contraignant la mobilité des enzymes d'un métabolon ou l'association de partenaires (non-)catalytiques (réticulons, sterol methyl transferases, membrane steroid-binding protein, synaptotagmine...)(Bassard et al., 2017). L'environnement cellulaire et des sous-domaines membranaires pourraient donc impacter le fonctionnement des métabolons.

Il reste cependant à déterminer :

- **la taille et la complexité des métabolons,**
- **la nature et le rôle des partenaires non-enzymatiques (protéiques, lipidiques ou moléculaires),**
- **la flexibilité et l'impact des métabolons sur l'efficacité et la plasticité du métabolisme.**

Mais le principal élément manquant est **une preuve directe de la formation d'un métabolon**, par exemple une visualisation *in situ*.

Dans le cas de métabolons impliquant des P450s, la quantification des P450s et de leurs partenaires redox, les P450 oxydoréductases chez les animaux et les plantes, démontre un excès important des P450s à la surface du RE (Estabrook et al., 1971; Shephard et al., 1983; Watanabe et al., 1993; Laursen et al., 2016). Plusieurs P450s doivent donc recevoir leurs électrons d'une même POR. Pour éviter une compétition des P450s appartenant à différentes voies métaboliques, une organisation fine de leur interaction avec la POR doit donc être envisagée. De plus, généralement, deux classes de PORs coexistent chez les plantes (Andersen et al., 2016; Parage et al., 2016). Mais aucune donnée expérimentale solide ne démontre des rôles distincts des deux classes de POR ou leur interaction préférentielle avec certains P450s, bien que les deux types de POR diffèrent très sensiblement par leur segment membranaire (Andersen et al., 2016). De plus, les P450s peuvent dans certains cas obtenir un électron des cytochromes *b5* qui apparaissent comme des composants importants, potentiellement structurants des métabolons.

La topologie, l'organisation et les interactions des P450s, des PORs et des cytochromes *b5* à la surface du RE ne sont pas connues et restent à être déterminées expérimentalement.

Comment aller plus loin ?

Les données collectées jusqu'ici souffrent d'une limitation et d'un possible biais, puisque les métabolons végétaux ont généralement été observés soit *in vitro*, soit *in vivo* en système hétérologue. Ceci implique une absence de l'environnement naturel (protéique, membranaire et moléculaire), une compétition entre la voie hétérologue et le métabolisme de l'hôte, et bien souvent un stress lié à la production de molécules et protéines exogènes chez l'hôte. Il serait donc **essentiel de pouvoir les observer dans un système stable et homologue pouvant être perturbé de manière contrôlée, dans le but de modifier la composition protéique (suppression ou fusion de partenaire) ou les flux métaboliques. Ceci afin d'étudier le rôle des métabolons comme régulateurs probables du métabolisme, mais aussi leur régulation par la cellule.**

Une information essentielle est actuellement manquante : la composition globale du métabolon, tant protéique que lipidique. L'approche la plus évidente pour obtenir cette information serait d'**isoler des métabolons**. Cependant l'utilisation des détergents, requis pour isoler des complexes membranaires, détruit les métabolons qui sont peu stables et transitoires. Une technique utilisant des SMALPs a été récemment développée et semble prometteuse (Laursen et al., 2016). Cette dernière peut encore être améliorée pour **isoler et identifier les protéines (non-catalytiques en particulier) ainsi que les lipides associés au métabolon**.

Le graal serait de pouvoir visualiser directement la formation de métabolons. Cela est à présent envisageable **grâce à de récentes avancées dans le domaine de la microscopie optique et électronique**, avec l'émergence de la cryo-microscopie et de la microscopie quantitative de fluorescence super-résolue (suivi de molécules uniques, spectroscopie de fluctuation de fluorescence). Le potentiel de ces nouvelles techniques a été mis en évidence dans les études des mécanismes réactionnels au sein des cellules animales (Harwardt et al., 2017) et dans de rares cas sur des modèles végétaux (Gronnier et al., 2017; Bücherl et al., 2017). Toutefois, leurs utilisations dans la caractérisation des métabolons végétaux nécessitent une optimisation des protocoles expérimentaux.

En parallèle des études *in vivo*, de nouvelles approches *in silico* sont actuellement mises en œuvre pour modéliser les interactions au sein d'un métabolon. Ceci permet d'élaborer des scénarios concernant la dynamique des métabolons, les flux d'intermédiaires métaboliques, les compétitions entre métabolons pour leurs composants et substrats. Ces scénarios devront être confrontés aux résultats *in vivo* (utilisation de mutants).

Pour aborder ce projet, je vais tout d'abord concentrer mes efforts sur un modèle végétal émergent, une mousse (*Physcomitrella Patens*) et une voie métabolique à fort débit et fortement canalisée, celle des phénylpropanoïdes.

*Le modèle *P. patens**

Ce modèle présente de nombreux avantages pour l'étude des métabolons :

- son **génom**e peut être facilement édité, soit par recombinaison homologue, soit par une approche CRISPR-Cas9 pour supprimer, muter ou remplacer un élément du métabolon, ou encore pour fusionner une protéine rapportrice à un gène cible (Lopez-Obando et al., 2016). Les techniques d'édition de génome sont facilitées par le fait que la génération dominante, servant à la transformation, est le gamétophore qui est haploïde,
- un génome de taille moyenne (479 Mpb) et un **nombre restreint d'enzymes du métabolisme codées par celui-ci** (e.g. 71 P450s contre 356 pour le riz, 246 pour Arabidopsis ou 312 pour le peuplier), impliquent la présence d'un métabolisme simplifié par rapport à ceux des

plantes supérieures (voies plus courtes et moins branchées, compétition entre voies métaboliques plus limitée). Cette simplification est confirmée par le profil métabolique de la plante (Renault et al., 2017a),

- Une **facilité de culture**, que ce soit sous forme de plante entière, sur boîte de Petri ou en fermenteur. La préparation de protoplastes est également possible (Maronova and Kalyna, 2016). Il est également possible de modifier de façon contrôlée les conditions de culture, afin de moduler les flux métaboliques (Wolf et al., 2010),
- une morphologie rudimentaire, avec notamment des **tissus gamétophytiques formés d'une monocouche cellulaire** et d'une **quantité limitée de pigments**. Ces caractéristiques avantageuses par rapport aux modèles végétaux supérieurs, limitent fortement les bruits parasites dans le cadre d'une utilisation de **techniques avancées de microscopie optique sensibles** (les microscopes à super-résolution ou les techniques de FCS). Ceci permet une hausse significative du signal sur bruit et ainsi de la précision de la mesure,
- une position très ancestrale chez les plantes terrestres, qui permet d'aborder la problématique de l'évolution des métabolites en parallèle de l'évolution d'un métabolisme complexe chez ces plantes,
- la production de molécules d'intérêt dans *P. patens* est possible par des approches d'ingénierie métabolique (Khairul Ikram et al., 2017). Celle-ci sera grandement facilitée par une bonne connaissance des métabolites.

Tout ceci fait de la mousse un **modèle à fort potentiel pour la recherche et les applications industrielles**.

La voie des phénylpropanoïdes

La voie des phénylpropanoïdes est l'une des **voies métaboliques majeures chez les plantes**, d'un point de vue quantitatif et qualitatif. Cette voie génère en effet de nombreux composés essentiels tant pour la physiologie de la plante (moyens de communication et de défense), que pour l'industrie : biopolymères (lignine et subérine), écrans UV et antioxydants (flavonoïdes, esters phénoliques, stilbènes), arômes, parfums, colorants, actifs cosmétiques, nutraceutiques et pharmacologiques.

La voie des phénylpropanoïdes est **l'une des voies de biosynthèse apparue le plus tôt au cours de l'évolution des plantes**. C'est l'une des mieux optimisées par l'évolution, en raison de son ancienneté, mais aussi de l'importance quantitative et développementale des flux métaboliques qui y sont gérés. La mousse ne génère pas de lignine, néanmoins le métabolisme phénolique est essentiel à son développement pour la formation de polymères cuticulaires contrôlant la perméabilité de surface et probablement la rigidité des tissus (Renault et al., 2017a). Ce métabolisme **s'apparente au métabolisme primaire**, par son caractère essentiel, et la forte pression de sélection qui s'exerce sur lui (illustrée par une forte conservation et une faible duplication des gènes). La sélection négative, qui s'exerce notamment sur les P450s en amont de la voie, implique une grande conservation du site actif mais également d'éléments de surface ou de contacts membranaires de ces enzymes (Matsuno et al., 2009; Renault et al., 2017b). L'ensemble de ces éléments suggèrent que **le métabolisme phénolique doit être l'une des voies métaboliques dont les flux sont les mieux canalisés chez les plantes**.

Les deux branches majeures les plus conservées du métabolisme phénolique conduisent l'une à la formation de polymères, l'autre à la formation de flavonoïdes (Figure 29). Chez les plantes supérieures, il existe des éléments de preuve de l'existence de métabolites contrôlant l'entrée dans chacune de ces branches (Achnine et al., 2004; Bassard et al., 2012; Lallemand et al., 2013; Dastmalchi et al., 2016; Dastmalchi and Facchini, 2016). L'activité de celles-ci peut être modulée en fonction des conditions environnementales (UV, blessure, dessiccation...) ou des tissus étudiés. Cette modulation offre la

possibilité d'analyser la partition des flux métaboliques et leur régulation, ainsi que les interactions ou interférences possibles entre les métabolons.

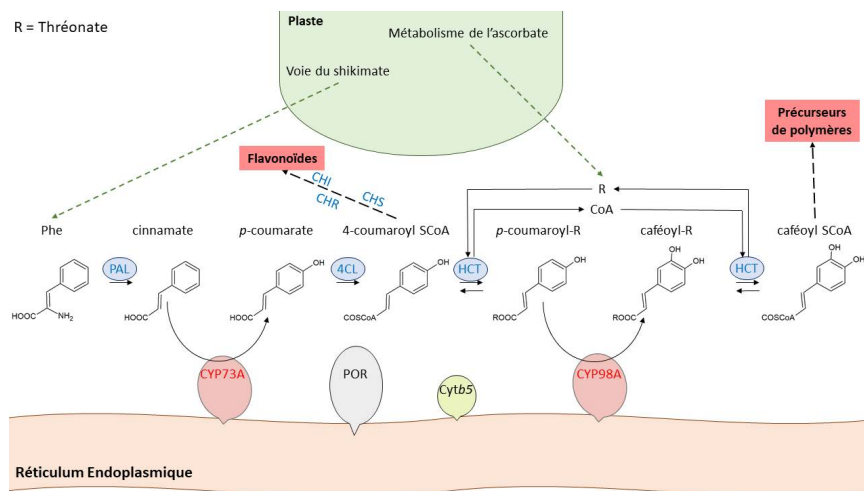


Figure 29. Voie phénolique chez *P. patens*

PAL, Phénylalanine Ammonia Lyase ; 4CL, 4-Coumaroyl CoA Ligase ; HCT, HydroxycinnamoylCoA Transférase ; POR, P450 OxydoRéductase ; CYS, Chalcone Synthase ; CHI, Chalcone Isomérase ; CHR, Chalcone Réductase ; Phe, Phénylalanine ; CoA, Coenzyme A. Les enzymes solubles cytosoliques sont en bleu. Les flèches hachurées vertes indiquent le transport de substrats à partir du plaste. Les flèches hachurées noires indiquent que plusieurs étapes biochimiques sont nécessaires pour la biosynthèse des métabolites mentionnés.

La structure du métabolisme phénolique évolue depuis l'émergence des charophytes, jusqu'à celle des bryophytes et des embryophytes. Cette évolution se traduit par une variation du nombre de copies de certains gènes clés de la voie métabolique. Ce métabolisme offre donc une possibilité d'étudier l'émergence, puis l'évolution des métabolons, ainsi que de la complexité du métabolisme lié.

Le métabolisme phénolique est aussi directement couplé au métabolisme primaire, qui contrôle l'activité de la branche conduisant aux précurseurs des biopolymères. Ce contrôle est opéré par des métabolites générés au niveau des plastides (shikimate, quinate, thréonate). L'hypothèse d'une association des métabolons correspondants, via le RE et les plastides, ainsi que le transport et l'incorporation des molécules précurseurs, mériteraient d'être approfondis.

Enfin, des données préliminaires suggèrent une canalisation de certains intermédiaires métaboliques (Renault et al., 2017a), ce qui est l'une des caractéristiques de la formation d'un métabolon.

Description du projet

Objectifs scientifiques

Les objectifs de mon projet seront d'étudier la formation des métabolons associés au métabolisme phénolique chez *P. patens*, afin de mieux comprendre :

- leurs composants et leurs structures,
- les mécanismes mis en jeu lors de leur assemblage et leur fonctionnement,
- leur impact sur le fonctionnement du métabolisme spécialisé,
- leur évolution.

Pour atteindre ces objectifs, il sera nécessaire de développer de nouvelles méthodes et approches adaptées au modèle *P. patens*. Un châssis qui pourra être utilisé pour l'étude d'autres métabolons, et des méthodes qui pourront être transférables à d'autres recherches.

Stratégie envisagée

Ce projet se subdivisera en 4 axes (Figure 30).

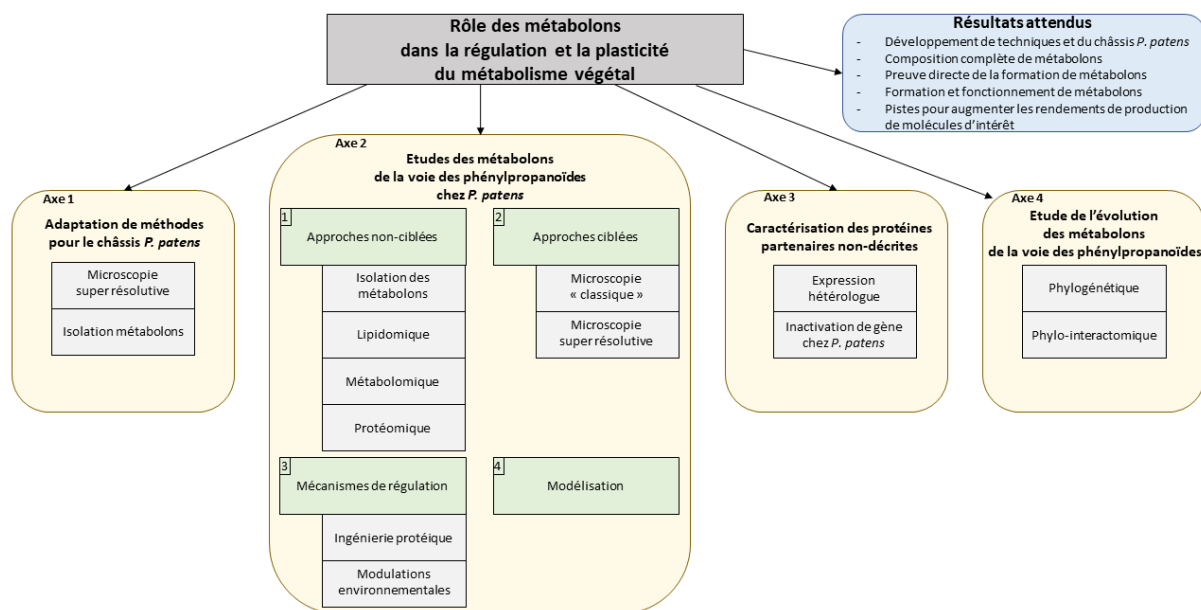


Figure 30. Résumé des axes de recherches et approches envisagées pour mon projet de recherche

Axe 1 : Développement de méthodes pour le châssis *P. patens*

Certaines méthodes envisagées pour approfondir la compréhension des métabolites ont rarement été employées sur des modèles végétaux, en raison des interférences résultant de la présence de la paroi végétale et des pigments végétaux, ou de la complexité des tissus ou des modifications génétiques à réaliser. Ce premier axe consistera à **tester et à développer des méthodes *ad hoc* pour le châssis *P. patens***.

Pour l'isolation des métabolites et l'identification des partenaires (catalytiques ou non-catalytiques), l'objectif sera d'améliorer la technique exploitant les SMALPs (Figure 25). Plusieurs nouveaux polymères ont été développés depuis la publication de la preuve de concept qui utilisait la POR comme appât (Laursen et al., 2016). Leur capacité à capturer les complexes métaboliques de *P. patens* sera testée, en utilisant comme appât soit la POR, soit les P450s de la voie des phénylpropanoïdes de *P. patens*.

Pour visualiser la dynamique des métabolites et de leurs constituants *in planta*, le suivi de protéines du métabolite en temps réel à la surface du RE par sPT (single Particle Tracking) est une voie prometteuse. La méthode sPT permet de retracer le mouvement de protéines de fusion fluorescentes (marquage par mEOS, PA-mCherry) au cours du temps (Li et al., 2011; Bücherl et al., 2017; Gronnier et al., 2017). Lorsque le sPT est associé à la microscopie 3D PALM-STORM (Photo-Activated Localization Microscopy – Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) il est possible de caractériser avec une très grande précision le comportement des protéines sous la limite de diffraction de la lumière. La technique 3D PALM-STORM est actuellement celle procurant la meilleure résolution en microscopie optique (Schermele et al., 2010). L'utilisation de plusieurs couleurs permet d'identifier les interactions moléculaires. Toutefois, les modèles de plantes supérieures sont peu adaptés à cette approche (difficulté d'avoir un signal sur bruit satisfaisant). Le modèle *P. patens*, par sa morphologie, présente un bruit beaucoup plus faible et permettrait l'utilisation de ces nouvelles approches de microscopie. Il serait donc possible d'observer et de quantifier la dynamique de déplacement et d'association des différentes protéines impliquées dans le métabolite et d'étudier l'influence des stimuli sur ces dynamiques.

Ces nouvelles approches à mettre en place seront complétées par l'utilisation d'autres techniques décrites dans l'axe 2.

Axe 2 : Etudes des métabolons de la voie des phénylpropanoïdes chez *P. patens*

Le deuxième axe aura pour objectif d'étudier *stricto sensu* les métabolons. Du fait de la nature transitoire, dynamique et fragile des métabolons, ceux-ci seront examinés par diverses techniques complémentaires.

2-1 Approches non-ciblées

Certaines études ont montré une association de partenaires non-catalytiques, ainsi qu'un effet des membranes sur les métabolons (Bassard et al., 2017). **L'objectif de cet axe sera d'isoler les métabolons complets et d'identifier leurs constituants, ainsi que l'environnement cellulaire interagissant avec eux.**

Pour isoler les métabolons et identifier les protéines qui les constituent, j'utiliserai les techniques basées sur les SMALPs et la TAP-tag. Pour chacune des techniques, il sera nécessaire d'utiliser indépendamment plusieurs appâts tagués (CYP73A, CYP98A, HCT, par exemple), afin de pouvoir recouper les résultats obtenus et comparer les protéines capturées par les différents appâts. J'envisage également de réaliser des gels 2D de polyacrylamide en condition native (2D BN-PAGE) d'extraits de protéines non-taguées de *P. patens*. Les protéines isolées par ces trois méthodes seront identifiées et quantifiées par spectrométrie de masse.

Différentes techniques seront utilisées pour mieux appréhender l'environnement cellulaire des métabolons. Les lipides isolés conjointement aux protéines à l'aide des SMALPs seront analysés. Dans les cellules où sont présents les métabolons étudiés, les métabolites primaires (acides, sucres, alcools, amines, aminoacides) pouvant entrer dans la composition de NADES (Choi et al., 2011) pourront être identifiés et quantifiés avec le Solarix XR™ (Bruker) de la plateforme métabolomique de l'IBMP. Le Solarix allie la spectrométrie de masse à très haute résolution (FT-ICR) et l'imagerie métabolique ("MALDI-imaging") (Han et al., 2016). Les NADES peuvent solubiliser les métabolites secondaires ou les protéines. Ils peuvent également les protéger contre différentes agressions (UV, température et temps) (Dai et al., 2013, 2014, 2016). Les NADES pourraient ainsi former un bouclier moléculaire autour des métabolons et créer divers micro-environnements à la surface du RE (Bassard et al., 2017).

2-2 Approches ciblées

Le second objectif de cet axe sera de valider les interactions protéine-protéine et protéine-membrane, et d'étudier comment les partenaires s'organisent spatialement et temporellement.

La validation des interactions des paires de protéines présentant un intérêt particulier se fera par des approches *in planta* à l'aide d'un microscope confocal équipé pour mesurer les paramètres de FRET/FLIM.

Afin de suivre la mobilité des métabolons et de leurs différents composants *in planta*, les protéines d'intérêt seront fusionnées avec des protéines fluorescentes classiques (eGFP, mRFP) pour déterminer les paramètres de diffusion d'une seule protéine de fusion fluorescente par FCS, ou la corrélation des paramètres de diffusion de deux protéines de fusion fluorescentes par FCCS (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy) (Bassard and Halkier, 2018). La technique 3D PALM-STORM développée durant l'axe 1 sera utilisée pour obtenir des images super résolutes et multi-couleurs des métabolons par l'emploi de protéines fluorescentes spécifiques (PA-mCherry, mEos2, par exemple). Cette technologie permettra également de retracer dans le temps le mouvement des protéines taguées à la surface du RE en utilisant des algorithmes de suivis de particules (sPT). Ces approches ont pour but d'identifier la dynamique de formation du cluster d'homo- ou hétéro-protéines et ainsi caractériser les mécanismes de formation et de dissociation du métabolon. L'ensemble de ces techniques *in planta*, permettra de collecter des données essentielles décrivant l'organisation des métabolons et leur durée de vie dans la cellule à la surface du RE.

2-3 Mécanismes de régulation

Il est admis que les métabolons sont des structures transitoires formées pour répondre à un besoin de la plante. **L'objectif à long terme de cet axe de travail sera donc de mieux comprendre les mécanismes qui gouvernent la formation des métabolons, mais également de tenter de mieux comprendre les effets des métabolons sur le métabolisme cellulaire.**

Un préalable au premier volet de ce travail sera de pouvoir mettre en évidence des effecteurs chimiques ou physiologiques (conditions de cultures) ayant un impact sur la formation ou la stabilité des métabolons. Il sera dès lors possible de mesurer statistiquement leurs effets sur les interactions protéine-protéine *in planta* en mettant à profit les différentes approches ciblées décrites précédemment (Axe 2-2). Cette analyse pourra être complétée par une comparaison des profils métaboliques (LC-MS, GC-MS) et l'évaluation des changements de flux métaboliques *in planta* après incorporation de précurseurs marqués.

Le second volet pourra être abordé par des approches d'ingénierie protéique *in planta* (mutation des zones d'interactions protéine-protéine et protéine-membrane ; fusion des partenaires ; mutation de partenaires non-enzymatiques) pour moduler la stabilité des métabolons, puis en déterminer les conséquences sur la voie des phénylpropanoïdes et le métabolisme général.

2-4 Modélisation

Lorsque suffisamment de données expérimentales auront été collectées, **les interactions protéine-membrane, protéine-protéine, puis le métabolon dans son ensemble pourront être modélisés.** Ceci permettra d'élaborer des scénarios concernant les régions d'interaction entre les différentes protéines, la dynamique des métabolons, les flux d'intermédiaires métaboliques, les compétitions entre métabolons vis-à-vis des précurseurs et des protéines (Fiorucci et al., 2007; Diharce et al., 2016). Certaines de ces hypothèses pourront être validées dans le contexte de l'axe 2.

Axe 3 : Caractérisation des protéines partenaires non-décrites, en particulier les protéines non-enzymatiques

Le travail non-ciblé de l'axe 2 permettra potentiellement d'identifier, 1) de nouvelles protéines impliquées dans la formation ou la stabilisation des métabolons, 2) des transporteurs de précurseurs ou de produits de la voie métabolique. **Si certaines de ces protéines n'ont pas d'homologue décrit dans la littérature, il sera intéressant de les étudier plus en détails.**

Leur caractérisation fonctionnelle pourra être réalisée après inactivation des gènes correspondants par une approche CRISPR-Cas9 chez *P. patens*, ou après expression hétérologue en bactérie, levure ou chez *N. benthamiana*.

Axe 4 : Etude de l'évolution des métabolons de la voie des phénylpropanoïdes

L'un de mes objectifs à long terme sera enfin de **comprendre comment se construit une voie métabolique, comment se stabilisent ses gènes et ses protéines, mais surtout comment se structure puis évolue un métabolon.** Les évolutions des enzymes constituant les métabolons de la voie des phénylpropanoïdes et de leurs protéines associées seront retracées. Il sera ensuite envisageable de tester l'évolution des interactions en testant les facultés d'interaction de paires de partenaires issus de différentes plantes représentatives en réutilisant les approches ciblées de l'axe 2. Il est également possible d'envisager le remplacement de partenaires chez *P. patens* par ceux de plantes plus ancestrales ou plus récentes (*Marchantia polymorpha*, *Arabidopsis thaliana*, *Sorghum bicolor*, par exemple).

Collaborations envisagées

Certaines des approches analytiques ne sont pas triviales et nécessiteront des expertises et des appareillages *ad hoc*. Pour la réussite de ce projet, divers partenariats, du niveau local au niveau international, sont donc envisagés.

Au niveau local

- L'**IBMP**. Mon projet mobilisera des expertises, des outils et des moyens expérimentaux performants des plateformes de l'institut (microscopie, métabolomique) équipées en appareillages de pointe (SolariX XR, par exemple). Il s'adossera à l'équipe « Evolution et diversité du métabolisme des plantes » sur des thématiques en place comme celle du développement de nouveaux modèles, incluant *P. patens* (H. Renault), de la phylogénomique du métabolisme des phénylpropanoïdes et de la caractérisation de voies métaboliques chez *P. patens* (H. Renault, F. Pinot).
- L'**UMR7213 de Strasbourg**, l'équipe « Biophotonique des interactions moléculaires et cellulaires » (L. Richert, Y. Mély). Pour développer et optimiser les méthodes avancées de microscopie de fluorescence (sPT, 3D PALM-STORM, F(C)CS) et le suivi des interactions protéine-protéine et des dynamiques moléculaires *in planta*.

Au niveau national

- L'**UMR7272**-Institut de Chimie de Nice. L'équipe « Arômes Parfums Synthèse et Modélisation » (Pr. S. Antonczak), pour la modélisation moléculaire des interactions ligand-récepteur, des interactions protéines-membrane et la réactivité des systèmes moléculaires.

Au niveau international

- L'**Université de Copenhague**, en particulier les équipes :
 - o « Plant Molecular Biology » du Pr. B. Halkier, pour étudier le transport et le stockage des métabolites, si des transporteurs sont associés aux métabolons.
 - o « Plant Biochemistry » du Pr. B.L. Møller, pour l'étude des métabolons et la valorisation des méthodes développées pour le châssis *P. patens*.
- L'**Université de Freiburg**, l'équipe de Pr. R. Reski, pour le développement du châssis mousse et des techniques associées.
- L'**Université de Birmingham**, l'équipe « Structural Biology and Molecular Biophysics » de Sir Pr. T. Dafforn, pour l'optimisation de l'extraction des métabolons de *P. patens* sans l'utilisation de détergent, mais à l'aide des polymères SMA.
- L'**Université d'Oxford**, l'équipe « Physical and Theoretical Chemistry » du Pr. C. Robinson, pour l'étude de métabolons intacts par spectrométrie de masse.

*"Un pessimiste fait de ses occasions des difficultés,
et un optimiste fait de ses difficultés des occasions." Antoine de Saint-Exupéry*

Conclusion et perspectives

Comme je le mentionnais dans l'introduction de ce dossier, les plantes sont de formidables réservoirs de molécules potentiellement utilisables par l'Homme. Mais les besoins grandissants pour certaines molécules mettent en danger les plantes les produisant, comme le taxol (anticancéreux) produit par un if endémique. La biodiversité végétale représente donc une richesse inestimable, à étudier, à comprendre, et à préserver.

Il est important d'identifier de nouvelles molécules végétales d'intérêt économique (comme durant le projet BACHBERRY), il est ensuite essentiel de comprendre la séquence des enzymes qui sont impliquées dans leur biosynthèse, et finalement comprendre comment ces enzymes s'organisent et sont régulées pour envisager de produire en masse les molécules intéressantes dans des hôtes telles que plantes, levures ou bactéries.

Depuis mon premier stage de Master à l'IBMP jusqu'à mes postes à l'Université de Copenhague, j'ai progressivement développé mes compétences pour l'étude du métabolisme végétal avec ses techniques analytiques et biochimiques associées. Je me suis particulièrement attaché à améliorer la compréhension de l'organisation spatiale des voies de biosynthèse dans la cellule. Mes travaux à l'Université de Copenhague m'ont permis de mettre en place un réseau de collaborations avec les meilleurs experts du domaine et de différentes techniques de pointe. Pendant ce temps de plus en plus d'études indépendantes ont démontré la formation de métabolons dans diverses voies de biosynthèse. La combinaison de mes compétences, les collaborations proposées, les techniques actuellement disponibles et le modèle d'étude de mon projet de recherche, font que le moment est opportun pour l'étude plus détaillée de métabolons d'une voie de biosynthèse modèle.

Mon projet est réalisé sur un modèle expérimental et biotechnologique émergent (*P. patens*) pour étudier la structure des voies métaboliques phénoliques et leurs régulations par la formation de métabolons, et à plus long terme l'évolution des métabolons et des familles de protéines associées. Le modèle *P. patens* est d'ores et déjà utilisé pour produire des biomolécules. Développer de nouvelles méthodes pour ce modèle permettra une meilleure compréhension de son métabolisme et améliorera son utilisabilité.

L'IBMP a pour objectif d'étudier les processus fondamentaux de la vie des plantes, et l'un de ses axes de recherche principaux est le métabolisme de la plante. Mon projet consiste à développer et utiliser des technologies originales et interdisciplinaires en s'adossant à de nombreux collaborateurs spécialistes, pour *in fine* améliorer la connaissance de l'organisation spatiale des métabolismes végétaux. Comme je le mentionnais dans les chapitres précédents, les métabolons, du fait de leur nature transitoire et fragile, sont particulièrement difficiles à étudier. La structure modulaire de mon projet offre une certaine souplesse dans sa réalisation, et de nombreuses techniques complémentaires seront utilisées en parallèle pour confirmer les résultats obtenus. Mon projet, s'intègre également dans une équipe constituée de chercheurs travaillant sur les origines des polymères phénoliques et aliphatiques des plantes terrestres, en utilisant entre autres *P. patens* comme modèle.

A plus long terme et avec différentes collaborations, mon projet pourra également être étendu à d'autres métabolismes ou d'autres organismes. Les connaissances qu'il sera possible d'acquérir sur l'organisation et le fonctionnement de métabolons dans la voie des phénylpropanoïdes seront transposables à d'autres voies métaboliques, comme celles étudiées à l'IBMP par F. Pinot, T. Heitz ou H. Schaller. Les différentes méthodes développées dans le cadre de mon travail bénéficieront également à d'autres équipes de l'IBMP intéressées par les interactions entre protéines et pourront être appliquées à d'autres organismes (bactéries, animaux) pour bénéficier à la communauté scientifique.

Il faut enfin souligner que les outils et connaissances générés dans le cadre de ce projet sont susceptibles d'ouvrir de nouvelles perspectives pour améliorer les rendements de production de molécules d'intérêt en biotechnologies et biologie synthétique. Tout ceci en accord avec les principes de lutte pour la préservation de la biodiversité.

" L'imagination est plus importante que le savoir " Albert Einstein

Bibliographie

- Abdulrazzak, N. et al.** (2006). A coumaroyl-ester-3-hydroxylase insertion mutant reveals the existence of nonredundant meta-hydroxylation pathways and essential roles for phenolic precursors in cell expansion and plant growth. *Plant Physiol.* **140**: 30–48.
- Achnine, L., Blancaflor, E.B., Rasmussen, S., and Dixon, R.A.** (2004). Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **16**: 3098–109.
- Ajikumar, P.K., Xiao, W.-H., Tyo, K.E.J., Wang, Y., Simeon, F., Leonard, E., Mucha, O., Phon, T.H., Pfeifer, B., and Stephanopoulos, G.** (2010). Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science* **330**: 70–4.
- Andersen, T.B., Hansen, N.B., Laursen, T., Weitzel, C., and Simonsen, H.T.** (2016). Evolution of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductases (POR) in Apiales – POR 1 is missing. *Mol. Phylogenet. Evol.* **98**: 21–28.
- Anterola, A.M. and Lewis, N.G.** (2002). Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* **61**: 221–294.
- Bak, S., Beisson, F., Bishop, G., Hamberger, B., Höfer, R., Paquette, S., and Werck-Reichhart, D.** (2011). Cytochromes p450. *Arab. B.* **9**: e0144.
- Bak, S., Kahn, R.A., Nielsen, H.L., Moller, B.L., and Halkier, B.A.** (1998). Cloning of three A-type cytochromes P450, CYP71E1, CYP98, and CYP99 from *Sorghum bicolor* (L.) Moench by a PCR approach and identification by expression in *Escherichia coli* of CYP71E1 as a multifunctional cytochrome P450 in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin. *Plant Mol. Biol.* **36**: 393–405.
- Bak, S., Olsen, C.E., Petersen, B.L., Moller, B.L., and Halkier, B.A.** (1999). Metabolic engineering of p-hydroxybenzylglucosinolate in *Arabidopsis* by expression of the cyanogenic CYP79A1 from *Sorghum bicolor*. *Plant J.* **20**: 663–671.
- Bassard, J.-E. et al.** (2012). Protein-protein and protein-membrane associations in the lignin pathway. *Plant Cell* **24**: 4465–82.
- Bassard, J.-E. and Halkier, B.A.** (2018). How to prove the existence of metabolons? *Phytochem. Rev.* **17**: 211–227.
- Bassard, J.-E., Møller, B.L., and Laursen, T.** (2017). Assembly of Dynamic P450-Mediated Metabolons-Order Versus Chaos. *Curr. Mol. Biol. reports* **3**: 37–51.
- Bell-Lelong, D.A., Cusumano, J.C., Meyer, K., and Chapple, C.** (1997). Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis*. Regulation in response to development and the environment. *Plant Physiol.* **113**: 729–38.
- Bernhardt, R.** (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.* **124**: 128–145.
- Bjarnholt, N., Neilson, E.H.J., Crocoll, C., Jørgensen, K., Motawia, M.S., Olsen, C.E., Dixon, D.P., Edwards, R., and Møller, B.L.** (2018). Glutathione transferases catalyze recycling of auto-toxic cyanogenic glucosides in sorghum. *Plant J.* **94**: 1109–1125.
- Boachon, B. et al.** (2015). CYP76C1 (Cytochrome P450)-Mediated Linalool Metabolism and the Formation of Volatile and Soluble Linalool Oxides in *Arabidopsis* Flowers: A Strategy for Defense against Floral Antagonists. *Plant Cell* **27**: 2972–90.
- Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M.** (2003). Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 519–546.
- Boudet, A.-M.** (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* **68**: 2722–2735.
- Brignac-Huber, L.M., Park, J.W., Reed, J.R., and Backes, W.L.** (2016). Cytochrome P450 Organization and Function Are Modulated by Endoplasmic Reticulum Phospholipid Heterogeneity. *Drug Metab. Dispos.* **44**: 1859–1866.
- Bücherl, C.A., Jarsch, I.K., Schudoma, C., Segonzac, C., Mbengue, M., Robatzek, S., MacLean, D., Ott, T., and Zipfel, C.** (2017). Plant immune and growth receptors share common signalling components but localise to distinct plasma membrane nanodomains. *Elife* **6**.
- Carvalho, E., Franceschi, P., Feller, A., Palmieri, L., Wehrens, R., and Martens, S.** (2013). A targeted metabolomics approach to understand differences in flavonoid biosynthesis in red and yellow raspberries. *Plant Physiol. Biochem.* **72**: 79–86.
- Catalgol, B., Batirel, S., Taga, Y., and Ozer, N.K.** (2012). Resveratrol: French paradox revisited. *Front. Pharmacol.*

- Chan, C.Y., Pedley, A.M., Kim, D., Xia, C., Zhuang, X., and Benkovic, S.J.** (2018). Microtubule-directed transport of purine metabolons drives their cytosolic transit to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*: 201814042.
- Chan, C.Y., Zhao, H., Pugh, R.J., Pedley, A.M., French, J., Jones, S.A., Zhuang, X., Jinnah, H., Huang, T.J., and Benkovic, S.J.** (2015). Purinosome formation as a function of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 1368–73.
- Chandrasekara, A. and Shahidi, F.** (2010). Content of Insoluble Bound Phenolics in Millets and Their Contribution to Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 6706–6714.
- Chen, H.-C., Li, Q., Shuford, C.M., Liu, J., Muddiman, D.C., Sederoff, R.R., and Chiang, V.L.** (2011). Membrane protein complexes catalyze both 4- and 3-hydroxylation of cinnamic acid derivatives in monolignol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 21253–8.
- Chen, H., Jiang, H., and Morgan, J.A.** (2007). Non-natural cinnamic acid derivatives as substrates of cinnamate 4-hydroxylase. *Phytochemistry* **68**: 306–311.
- Choi, Y.H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I.W.C.E., Witkamp, G.-J., and Verpoorte, R.** (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol.* **156**: 1701–5.
- Czichi, U. and Kindl, H.** (1975). Formation of p-coumaric acid and o-coumaric acid from L-phenylalanine by microsomal membrane fractions from potato: Evidence of membrane-bound enzyme complexes. *Planta* **125**: 115–25.
- Czichi, U. and Kindl, H.** (1977). Phenylalanine ammonia lyase and cinnamic acid hydroxylases as assembled consecutive enzymes on microsomal membranes of cucumber cotyledons: Cooperation and subcellular distribution. *Planta* **134**: 133–43.
- D'Auria, J.C.** (2006). Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 331–340.
- D'Auria, J.C., Pichersky, E., Schaub, A., Hansel, A., and Gershenzon, J.** (2007a). Characterization of a BAHD acyltransferase responsible for producing the green leaf volatile (Z)-3-hexen-1-yl acetate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **49**: 194–207.
- D'Auria, J.C., Reichelt, M., Luck, K., Svatoš, A., and Gershenzon, J.** (2007b). Identification and characterization of the BAHD acyltransferase malonyl CoA: Anthocyanidin 5- O -glucoside-6''- O -malonyltransferase (At5MAT) in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **581**: 872–878.
- Dai, Y., Rozema, E., Verpoorte, R., and Choi, Y.H.** (2016). Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *J. Chromatogr. A* **1434**: 50–56.
- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G.-J., Verpoorte, R., and Choi, Y.H.** (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta* **766**: 61–68.
- Dai, Y., Verpoorte, R., and Choi, Y.H.** (2014). Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food Chem.* **159**: 116–121.
- Das, A. and Sligar, S.G.** (2009). Modulation of the cytochrome P450 reductase redox potential by the phospholipid bilayer. *Biochemistry* **48**: 12104–12.
- Dastmalchi, M., Bernards, M.A., and Dhaubhadel, S.** (2016). Twin anchors of the soybean isoflavonoid metabolon: evidence for tethering of the complex to the endoplasmic reticulum by IFS and C4H. *Plant J.* **85**: 689–706.
- Dastmalchi, M. and Facchini, P.** (2016). Plant metabolons assembled on demand. *Science (80-.)*. **354**: 829–830.
- Didierjean, L., Gondet, L., Perkins, R., Lau, S.-M.C., Schaller, H., O'Keefe, D.P., and Werck-Reichhart, D.** (2002). Engineering herbicide metabolism in tobacco and *Arabidopsis* with CYP76B1, a cytochrome P450 enzyme from Jerusalem artichoke. *Plant Physiol.* **130**: 179–89.
- Diharce, J., Golebiowski, J., Fiorucci, S., and Antonczak, S.** (2016). Fine-tuning of microsolvation and hydrogen bond interaction regulates substrate channelling in the course of flavonoid biosynthesis. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**: 10337–10345.
- Dörr, J.M., Koorengevel, M.C., Schäfer, M., Prokofyev, A. V, Scheidelaar, S., van der Crujisen, E.A.W., Dafforn, T.R., Baldus, M., and Killian, J.A.** (2014). Detergent-free isolation, characterization, and functional reconstitution of a tetrameric K⁺ channel: the power of native nanodiscs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**:

18607–12.

- Eberle, D., Ullmann, P., Werck-Reichhart, D., and Petersen, M.** (2009). cDNA cloning and functional characterisation of CYP98A14 and NADPH:cytochrome P450 reductase from *Coleus blumei* involved in rosmarinic acid biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* **69**: 239–253.
- Ehltling, J. et al.** (2005). Global transcript profiling of primary stems from *Arabidopsis thaliana* identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation. *Plant J.* **42**: 618–640.
- Ehltling, J., Buttner, D., Wang, Q., Douglas, C.J., Somssich, I.E., and Kombrink, E.** (1999). Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant J.* **19**: 9–20.
- Ehltling, J., Sauveplane, V., Olry, A., Ginglinger, J.-F., Provart, N.J., and Werck-Reichhart, D.** (2008). An extensive (co-)expression analysis tool for the cytochrome P450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* **8**: 47.
- Estabrook, R.W., Franklin, M.R., Cohen, B., Shigamatzu, A., and Hildebrandt, A.G.** (1971). Influence of hepatic microsomal mixed function oxidation reactions on cellular metabolic control. *Metabolism* **20**: 187–199.
- Fahrendorf, T. and Dixon, R.A.** (1993). Stress Responses in Alfalfa (*Medicago sativa* L.) XVIII: Molecular Cloning and Expression of the Elicitor-Inducible Cinnamic Acid 4-Hydroxylase Cytochrome P450. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**: 509–515.
- Fiorucci, S., Golebiowski, J., Cabrol-Bass, D., and Antonczak, S.** (2007). Molecular simulations bring new insights into flavonoid/querceetinase interaction modes. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **67**: 961–970.
- Franke, R., Humphreys, J.M., Hemm, M.R., Denault, J.W., Ruegger, M.O., Cusumano, J.C., and Chapple, C.** (2002). The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.* **30**: 33–45.
- Gachon, C.M.M., Langlois-Meurinne, M., and Saindrenan, P.** (2005). Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. *Trends Plant Sci.* **10**: 542–549.
- Gang, D.R., Beuerle, T., Ullmann, P., Werck-Reichhart, D., and Pichersky, E.** (2002). Differential production of meta hydroxylated phenylpropanoids in sweet basil peltate glandular trichomes and leaves is controlled by the activities of specific acyltransferases and hydroxylases. *Plant Physiol.* **130**: 1536–44.
- Garfinkel, D.** (1958). Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* **77**: 493–509.
- Ginglinger, J.-F. et al.** (2013). Gene coexpression analysis reveals complex metabolism of the monoterpene alcohol linalool in *Arabidopsis* flowers. *Plant Cell* **25**: 4640–57.
- Goldstein, J.A. and Faletto, M.B.** (1993). Advances in mechanisms of activation and deactivation of environmental chemicals. *Environ. Health Perspect.* **100**: 169–76.
- González, C.G., Mustafa, N.R., Wilson, E.G., Verpoorte, R., and Choi, Y.H.** (2018). Application of natural deep eutectic solvents for the “green” extraction of vanillin from vanilla pods. *Flavour Fragr. J.* **33**: 91–96.
- Goszcz, K., Deakin, S.J., Duthie, G.G., Stewart, D., Leslie, S.J., and Megson, I.L.** (2015). Antioxidants in Cardiovascular Therapy: Panacea or False Hope? *Front. Cardiovasc. Med.* **2**: 29.
- Graciet, E., Lebreton, S., and Gontero, B.** (2004). Emergence of new regulatory mechanisms in the Benson-Calvin pathway via protein-protein interactions: a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/CP12/phosphoribulokinase complex. *J. Exp. Bot.* **55**: 1245–1254.
- Graham, J.W.A., Williams, T.C.R., Morgan, M., Fernie, A.R., Ratcliffe, R.G., and Sweetlove, L.J.** (2007). Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. *Plant Cell* **19**: 3723–38.
- Grand View Research** (2016). Polyphenols Market Projected To Reach \$ 1 . 33 Billion By 2024.: 1–9.
- Gravot, A., Lariat, 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.
- Grienenberger, E., Besseau, S., Geoffroy, P., Debayle, D., Heintz, D., Lapierre, C., Pollet, B., Heitz, T., and Legrand, M.** (2009). A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *Plant J.* **58**: 246–259.

- Gronnier, J. et al.** (2017). Structural basis for plant plasma membrane protein dynamics and organization into functional nanodomains. *Elife* **6**.
- Halkier, B.A. and Moller, B.L.** (1989). Biosynthesis of the Cyanogenic Glucoside Dhurrin in Seedlings of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and Partial Purification of the Enzyme System Involved. *Plant Physiol.* **90**: 1552–1559.
- Hamberger, B. and Hahlbrock, K.** (2004). The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 2209–14.
- Han, F., Li, Y., Mao, X., Xu, R., and Yin, R.** (2016). Characterization of chemical constituents in *Rhodiola Crenulate* by high-performance liquid chromatography coupled with Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (HPLC-FT-ICR MS). *J. Mass Spectrom.* **51**: 363–8.
- Hartmann, T.N., Fricker, M.D., Rennenberg, H., and Meyer, A.J.** (2003). Cell-specific measurement of cytosolic glutathione in poplar leaves. *Plant, Cell Environ.* **26**: 965–975.
- Harwardt, M.-L.I.E., Young, P., Bley Müller, W.M., Meyer, T., Karathanasis, C., Niemann, H.H., Heilemann, M., and Dietz, M.S.** (2017). Membrane dynamics of resting and internalin B-bound MET receptor tyrosine kinase studied by single-molecule tracking. *FEBS Open Bio* **7**: 1422–1440.
- Hemm, M.R., Rider, S.D., Ogas, J., Murry, D.J., and Chapple, C.** (2004). Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* **38**: 765–778.
- Heraud, P., Cowan, M.F., Marzec, K.M., Møller, B.L., Blomstedt, C.K., and Gleadow, R.** (2018). Label-free Raman hyperspectral imaging analysis localizes the cyanogenic glucoside dhurrin to the cytoplasm in sorghum cells. *Sci. Rep.* **8**: 2691.
- Höfer, R., Boachon, B., Renault, H., Gavira, C., Miesch, L., Iglesias, J., Ginglinger, J.-F., Allouche, L., Miesch, M., Grec, S., Labat, R., and Werck-Reichhart, D.** (2014). Dual function of the cytochrome P450 CYP76 family from *Arabidopsis thaliana* in the metabolism of monoterpenols and phenylurea herbicides. *Plant Physiol.* **166**: 1149–61.
- Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet, B., and Legrand, M.** (2004). Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **16**: 1446–65.
- Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P., and Legrand, M.** (2003). Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinic acid ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J. Biol. Chem.* **278**: 95–103.
- Hösel, W., Tober, I., Eklund, S.H., and Conn, E.E.** (1987). Characterization of β -glucosidases with high specificity for the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) moench seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* **252**: 152–162.
- Hrazdina, G. and Wagner, G.J.** (1985). Metabolic pathways as enzyme complexes: Evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes. *Arch. Biochem. Biophys.* **237**: 88–100.
- Ishikawa, M., Tsuchiya, D., Oyama, T., Tsunaka, Y., and Morikawa, K.** (2004). Structural basis for channelling mechanism of a fatty acid β -oxidation multienzyme complex. *EMBO J.* **23**: 2745–2754.
- Jones, P.R., Moller, B.L., and Hoj, P.B.** (1999). The UDP-glucose:p-hydroxymandelonitrile-O-glucosyltransferase that catalyzes the last step in synthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor*. Isolation, cloning, heterologous expression, and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **274**: 35483–91.
- Jørgensen, K., Rasmussen, A.V., Morant, M., Nielsen, A.H., Bjarnholt, N., Zagrobelny, M., Bak, S., and Møller, B.L.** (2005). Metabolon formation and metabolic channelling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 280–291.
- Khairul Ikram, N.K.B., Beyraghdar Kashkooli, A., Peramuna, A.V., van der Krol, A.R., Bouwmeester, H., and Simonsen, H.T.** (2017). Stable Production of the Antimalarial Drug Artemisinin in the Moss *Physcomitrella patens*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **5**: 47.
- Khan, R.A., Elhassan, G.O., and Qureshi, K.A.** (2014). Nutraceuticals: In the treatment & prevention of diseases –an overview. *Pharma Innov. J.* **3**: 47–50.
- Klingenberg, M.** (1958). Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **75**: 376–386.
- Kojima, M., Poulton, J.E., Thayer, S.S., and Conn, E.E.** (1979). Tissue Distributions of Dhurrin and of Enzymes Involved in Its Metabolism in Leaves of *Sorghum bicolor*. *Plant Physiol.* **63**: 1022–8.

- Kristensen, C., Morant, M., Olsen, C.E., Ekstrøm, C.T., Galbraith, D.W., Møller, B.L., and Bak, S. (2005). Metabolic engineering of dhurrin in transgenic Arabidopsis plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 1779–84.
- Kwiatkowska, M., Polit, J.T., Stępiński, D., Popłońska, K., Wojtczak, A., Domínguez, E., and Heredia, A. (2015). Lipotubuloids in ovary epidermis of *Ornithogalum umbellatum* act as metabolons: suggestion of the name “lipotubuloid metabolon”. *J. Exp. Bot.* **66**: 1157–63.
- Kyoung, M., Russell, S.J., Kohnhorst, C.L., Esemoto, N.N., and An, S. (2015). Dynamic architecture of the purinosome involved in human de novo purine biosynthesis. *Biochemistry* **54**: 870–80.
- Lallemand, B., Erhardt, M., Heitz, T., and Legrand, M. (2013). Sporopollenin biosynthetic enzymes interact and constitute a metabolon localized to the endoplasmic reticulum of tapetum cells. *Plant Physiol.* **162**: 616–25.
- Laursen, T. et al. (2016). Characterization of a dynamic metabolon producing the defense compound dhurrin in sorghum. *Science* **354**: 890–893.
- Lee, D., Meyer, K., Chapple, C., and Douglas, C.J. (1997). Antisense suppression of 4-coumarate:coenzyme A ligase activity in Arabidopsis leads to altered lignin subunit composition. *Plant Cell* **9**: 1985–98.
- Lee, S.C., Knowles, T.J., Postis, V.L.G., Jamshad, M., Parslow, R.A., Lin, Y., Goldman, A., Sridhar, P., Overduin, M., Muench, S.P., and Dafforn, T.R. (2016). A method for detergent-free isolation of membrane proteins in their local lipid environment. *Nat. Protoc.* **11**: 1149–1162.
- Li, X. and Chapple, C. (2010). Understanding lignification: challenges beyond monolignol biosynthesis. *Plant Physiol.* **154**: 449–52.
- Li, X., Wang, X., Yang, Y., Li, R., He, Q., Fang, X., Luu, D.-T., Maurel, C., and Lin, J. (2011). Single-molecule analysis of PIP2;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of Arabidopsis plasma membrane aquaporin regulation. *Plant Cell* **23**: 3780–97.
- Lindermayr, C., Möllers, B., Fliegmann, J., Uhlmann, A., Lottspeich, F., Meimberg, H., and Ebel, J. (2002). Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate:coenzyme A ligase gene family. *Eur. J. Biochem.* **269**: 1304–1315.
- Ljevar, A., Ćurko, N., Tomašević, M., Radošević, K., Srček, V.G., and Ganić, K.K. (2016). Phenolic Composition, Antioxidant Capacity and in vitro Cytotoxicity Assessment of Fruit Wines. *Food Technol. Biotechnol.* **54**: 145–155.
- Lopez-Obando, M., Hoffmann, B., Géry, C., Guyon-Debast, A., Téoulé, E., Rameau, C., Bonhomme, S., and Nogué, F. (2016). Simple and Efficient Targeting of Multiple Genes Through CRISPR-Cas9 in *Physcomitrella patens*. *G3 (Bethesda)*. **6**: 3647–3653.
- Luo, J. et al. (2007). Convergent evolution in the BAHD family of acyl transferases: identification and characterization of anthocyanin acyl transferases from Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **50**: 678–695.
- Luu, W., Hart-Smith, G., Sharpe, L.J., and Brown, A.J. (2015). The terminal enzymes of cholesterol synthesis, DHCR24 and DHCR7, interact physically and functionally. *J. Lipid Res.* **56**: 888–97.
- Mahesh, V., Million-Rousseau, R., Ullmann, P., Chabrilange, N., Bustamante, J., Mondolot, L., Morant, M., Noirot, M., Hamon, S., de Kochko, A., Werck-Reichhart, D., and Campa, C. (2007). Functional characterization of two p-coumaroyl ester 3'-hydroxylase genes from coffee tree: evidence of a candidate for chlorogenic acid biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* **64**: 145–159.
- Mansuy, D. (1998). The great diversity of reactions catalyzed by cytochromes P450. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **121**: 5–14.
- Marhuenda, J., Alemán, M.D., Gironés-Vilaplana, A., Pérez, A., Caravaca, G., Figueroa, F., Mulero, J., and Zafrilla, P. (2016). Phenolic Composition, Antioxidant Activity, and *In Vitro* Availability of Four Different Berries. *J. Chem.* **2016**: 1–7.
- Market research future (2018). Phenolic Antioxidant Market Research Report- Forecast to 2023.
- Maronova, M. and Kalyna, M. (2016). Generating Targeted Gene Knockout Lines in *Physcomitrella patens* to Study Evolution of Stress-Responsive Mechanisms. *Methods Mol. Biol.* **1398**: 221–34.
- Matsuno, M. et al. (2009). Evolution of a novel phenolic pathway for pollen development. *Science* **325**: 1688–92.
- Matsuno, M., Nagatsu, A., Ogiwara, Y., Ellis, B.E., and Mizukami, H. (2002). *CYP98A6* from *Lithospermum erythrorhizon* encodes 4-coumaroyl-4'-hydroxyphenyllactic acid 3-hydroxylase involved in rosmarinic acid

- biosynthesis¹. FEBS Lett. **514**: 219–224.
- McDougall, G., Martinussen, I., and Stewart, D.** (2008). Towards fruitful metabolomics: High throughput analyses of polyphenol composition in berries using direct infusion mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **871**: 362–369.
- Meyer, A.J., May, M.J., and Fricker, M.** (2001). Quantitative in vivo measurement of glutathione in Arabidopsis cells. *Plant J.* **27**: 67–78.
- Miladinović, B., Kostić, M., Šavikin, K., Đorđević, B., Mihajilov-Krstev, T., Živanović, S., and Kitić, D.** (2014). Chemical Profile and Antioxidative and Antimicrobial Activity of Juices and Extracts of 4 Black Currants Varieties (*Ribes nigrum* L.). *J. Food Sci.* **79**: C301–C309.
- Miles, E.W., Rhee, S., and Davies, D.R.** (1999). The molecular basis of substrate channeling. *J. Biol. Chem.* **274**: 12193–6.
- Mizutani, M. and Ohta, D.** (2010). Diversification of P450 Genes During Land Plant Evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 291–315.
- Mizutani, M., Ohta, D., and Sato, R.** (1997). Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-hydroxylase from Arabidopsis and its expression manner in planta. *Plant Physiol.* **113**: 755–63.
- Mizutani, M., Ward, E., Dimaio, J., Ohta, D., Ryals, J., and Sato, R.** (1993). Molecular Cloning and Sequencing of a cDNA Encoding Mung Bean Cytochrome P450 (P450C4H) Possessing Cinnamate 4-Hydroxylase Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **190**: 875–880.
- Møller, B.** (2010). Dynamic metabolons. *Science* (80-.). **330**: 1328–9.
- Møller, B.L. and Conn, E.E.** (1980). The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. Channeling of intermediates in dhurrin biosynthesis by a microsomal system from *Sorghum bicolor* (Linn) Moench. *J. Biol. Chem.* **255**: 3049–56.
- Møller, B.L., Olsen, C.E., and Motawia, M.S.** (2016). General and Stereocontrolled Approach to the Chemical Synthesis of Naturally Occurring Cyanogenic Glucosides. *J. Nat. Prod.* **79**: 1198–1202.
- Morant, A.V., Jørgensen, K., Jørgensen, C., Paquette, S.M., Sánchez-Pérez, R., Møller, B.L., and Bak, S.** (2008). β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry* **69**: 1795–1813.
- Morant, M., Bak, S., Møller, B.L., and Werck-Reichhart, D.** (2003). Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 151–162.
- Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M.C., and Mazzafera, P.** (2010). Abiotic and Biotic Stresses and Changes in the Lignin Content and Composition in Plants. *J. Integr. Plant Biol.* **52**: 360–376.
- Nair, P.M. and Vining, L.C.** (1965). Cinnamic acid hydroxylase in spinach. *Phytochemistry* **4**: 161–168.
- Nair, R.B., Xia, Q., Kartha, C.J., Kurylo, E., Hirji, R.N., Datla, R., and Selvaraj, G.** (2002). Arabidopsis CYP98A3 mediating aromatic 3-hydroxylation. Developmental regulation of the gene, and expression in yeast. *Plant Physiol.* **130**: 210–20.
- Nedelkina, S., Jupe, S.C., Blee, K.A., Schalk, M., Werck-Reichhart, D., and Bolwell, G.P.** (1999). Novel characteristics and regulation of a divergent cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A15) from French bean: engineering expression in yeast. *Plant Mol. Biol.* **39**: 1079–90.
- Nelson, D.R.** (2018). Cytochrome P450 diversity in the tree of life. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1866**: 141–154.
- Nelson, D.R.** (2004). Cytochrome P450 Nomenclature, 2004. In *Cytochrome P450 Protocols* (Humana Press: New Jersey), pp. 1–10.
- Omura, T. and Sato, R.** (1964a). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* **239**: 2370–8.
- Omura, T. and Sato, R.** (1964b). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Solubilization, purification, and properties. *J. Biol. Chem.* **239**: 2379–85.
- Overkamp, S., Hein, F., and Barz, W.** (2000). Cloning and characterization of eight cytochrome P450 cDNAs from chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures. *Plant Sci.* **155**: 101–108.
- Paddon, C.J. et al.** (2013). High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* **496**: 528–532.
- Pandey, R.P., Parajuli, P., Koffas, M.A.G., and Sohng, J.K.** (2016). Microbial production of natural and non-

- natural flavonoids: Pathway engineering, directed evolution and systems/synthetic biology. *Biotechnol. Adv.* **34**: 634–662.
- Panicot, M., Minguet, E.G., Ferrando, A., Alcázar, R., Blázquez, M.A., Carbonell, J., Altabella, T., Koncz, C., and Tiburcio, A.F.** (2002). A polyamine metabolon involving aminopropyl transferase complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 2539–51.
- Parage, C. et al.** (2016). Class II Cytochrome P450 Reductase Governs the Biosynthesis of Alkaloids. *Plant Physiol.* **172**: 1563–1577.
- Pavli, O., Vlachos, C., Kalloniati, C., Flemetakis, E., and Skaracis, G.** (2013). Metabolite profiling reveals the effect of drought on sorghum ("*Sorghum bicolor*" L. Moench) metabolism *Plant Omic.* (Southern Cross Publishing).
- Pičmanová, M. et al.** (2015). A recycling pathway for cyanogenic glycosides evidenced by the comparative metabolic profiling in three cyanogenic plant species. *Biochem. J.* **469**: 375–89.
- Pierrel, M.A., Batard, Y., Kazmaier, M., Mignotte-Vieux, C., Durst, F., and Werck-Reichhart, D.** (1994). Catalytic Properties of the Plant Cytochrome P450 CYP73 Expressed in Yeast. Substrate Specificity of a Cinnamate Hydroxylase. *Eur. J. Biochem.* **224**: 835–844.
- Ralph, J., Guillaumie, S., Grabber, J.H., Lapierre, C., and Barrière, Y.** (2004). Genetic and molecular basis of grass cell-wall biosynthesis and degradability. III. Towards a forage grass ideotype. *C. R. Biol.* **327**: 467–479.
- Ralston, L. and Yu, O.** (2006). Metabolons involving plant cytochrome P450s. *Phytochem. Rev.* **5**: 459–472.
- Rasmussen, S. and Dixon, R.** (1999). Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* **11**: 1537–52.
- Reed, J.R. and Backes, W.L.** (2016). The functional effects of physical interactions involving cytochromes P450: putative mechanisms of action and the extent of these effects in biological membranes. *Drug Metab. Rev.* **48**: 453–69.
- Renaud, S. and de Lorgeril, M.** (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **339**: 1523–1526.
- Renault, H. et al.** (2017a). A phenol-enriched cuticle is ancestral to lignin evolution in land plants. *Nat. Commun.* **8**: 14713.
- Renault, H., De Marothy, M., Jonasson, G., Lara, P., Nelson, D.R., Nilsson, I., André, F., von Heijne, G., and Werck-Reichhart, D.** (2017b). Gene Duplication Leads to Altered Membrane Topology of a Cytochrome P450 Enzyme in Seed Plants. *Mol. Biol. Evol.* **34**: 2041–2056.
- Richard A. Moyer, †, Kim E. Hummer, ‡, Chad E. Finn, §, Balz Frei, || and, and Ronald E. Wrolstad*, ⊥** (2001). Anthocyanins, Phenolics, and Antioxidant Capacity in Diverse Small Fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*.
- Ro, D.-K. and Douglas, C.J.** (2004). Reconstitution of the entry point of plant phenylpropanoid metabolism in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): implications for control of metabolic flux into the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* **279**: 2600–7.
- Robineau, T., Batard, Y., Nedelkina, S., Cabello-Hurtado, F., LeRet, M., Sorokine, O., Didierjean, L., and Werck-Reichhart, D.** (1998). The chemically inducible plant cytochrome P450 CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and other xenobiotics. *Plant Physiol.* **118**: 1049–56.
- Ruiz, A., Hermosín-Gutiérrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., Dorau, C., Winterhalter, P., and von Baer, D.** (2010). Polyphenols and Antioxidant Activity of Calafate (*Berberis microphylla*) Fruits and Other Native Berries from Southern Chile. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 6081–6089.
- Sander mann, H.** (1994). Higher plant metabolism of xenobiotics: the "green liver" concept. *Pharmacogenetics* **4**: 225–41.
- Saunders, J.A. and Conn, E.E.** (1978). Presence of the cyanogenic glucoside dhurrin in isolated vacuoles from sorghum. *Plant Physiol.* **61**: 154–7.
- Schalk, Batard, Seyer, Nedelkina, Durst, and Werck-Reichhart** (1997a). Design of Fluorescent Substrates and Potent Inhibitors of CYP73As, P450s That Catalyze 4-Hydroxylation of Cinnamic Acid in Higher Plants†.
- Schalk, M., Pierrel, M.-A., Zimmerlin, A., Batard, Y., Durst, F., and Werck-Reichhart, D.** (1997b). Xenobiotics: Substrates and inhibitors of the plant cytochrome P450. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **4**: 229–234.
- Schermelleh, L., Heintzmann, R., and Leonhardt, H.** (2010). A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* **190**: 165–75.

- Schillmiller, A.L., Stout, J., Weng, J.-K., Humphreys, J., Ruegger, M.O., and Chapple, C.** (2009). Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in Arabidopsis. *Plant J.* **60**: 771–782.
- Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., and Werck-Reichhart, D.** (2001). CYP98A3 from Arabidopsis thaliana is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* **276**: 36566–74.
- Shephard, E.A., Phillips, I.R., Bayney, R.M., Pike, S.F., and Rabin, B.R.** (1983). Quantification of NADPH: cytochrome P-450 reductase in liver microsomes by a specific radioimmunoassay technique. *Biochem. J.* **211**: 333–40.
- Sibbesen, O., Koch, B., Halkier, B.A., and Møller, B.L.** (1994). Isolation of the heme-thiolate enzyme cytochrome P-450TYR, which catalyzes the committed step in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in Sorghum bicolor (L.) Moench. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 9740–4.
- Simmons, B.A., Loqué, D., and Ralph, J.** (2010). Advances in modifying lignin for enhanced biofuel production. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**: 312–319.
- Soltani, B.M., Ehltling, J., Hamberger, B., and Douglas, C.J.** (2006). Multiple cis-regulatory elements regulate distinct and complex patterns of developmental and wound-induced expression of Arabidopsis thaliana 4CL gene family members. *Planta* **224**: 1226–1238.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., and Youngs, H.** (2004). Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* **306**: 2206–11.
- Srere, P.A.** (1987). Complexes of Sequential Metabolic Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 89–124.
- Srere, P.A. and Ovadi, J.** (1990). Enzyme-enzyme interactions and their metabolic role. *FEBS Lett.* **268**: 360–364.
- Stafford, H.** (1974). Possible multienzyme complexes regulating the formation of C6-C3 phenolic compounds and lignins in higher plants. *Recent Adv. Phytochem.* **8**: 53–79.
- Stroud, Z., Hall, S.C.L., and Dafforn, T.R.** (2018). Purification of membrane proteins free from conventional detergents: SMA, new polymers, new opportunities and new insights. *Methods* **147**: 106–117.
- Szcebara, F.M. et al.** (2003). Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nat. Biotechnol.* **21**: 143–149.
- Szczesna-Skorupa, E. and Kemper, B.** (2006). BAP31 is involved in the retention of cytochrome P450 2C2 in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **281**: 4142–8.
- Tattersall, D.B., Bak, S., Jones, P.R., Olsen, C.E., Nielsen, J.K., Hansen, M.L., Høj, P.B., and Møller, B.L.** (2001). Resistance to an herbivore through engineered cyanogenic glucoside synthesis. *Science* **293**: 1826–8.
- 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**: 4102–6.
- Thayer, S.S. and Conn, E.E.** (1981). Subcellular Localization of Dhurrin beta-Glucosidase and Hydroxynitrile Lyase in the Mesophyll Cells of Sorghum Leaf Blades. *Plant Physiol.* **67**: 617–22.
- Tohge, T. et al.** (2005). Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of Arabidopsis plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant J.* **42**: 218–235.
- 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**: 19176–86.
- Urban, P., Werck-Reichhart, D., Teutsch, H.G., Durst, F., Regnier, S., Kazmaier, M., and Pompon, D.** (1994). Characterization of recombinant plant cinnamate 4-hydroxylase produced in yeast. Kinetic and spectral properties of the major plant P450 of the phenylpropanoid pathway. *Eur. J. Biochem.* **222**: 843–850.
- Vanholme, R., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W.** (2008). Lignin engineering. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 278–285.
- Vogt, T.** (2010). Phenylpropanoid Biosynthesis. *Mol. Plant* **3**: 2–20.
- Wang, J., Guleria, S., Koffas, M.A., and Yan, Y.** (2016). Microbial production of value-added nutraceuticals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **37**: 97–104.

- Watanabe, J., Asaka, Y., Fujimoto, S., and Kanamura, S.** (1993). Densities of NADPH-ferrihemoprotein reductase and cytochrome P-450 molecules in the endoplasmic reticulum membrane of rat hepatocytes. *J. Histochem. Cytochem.* **41**: 43–9.
- Weng, J.-K. and Chapple, C.** (2010). The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol.* **187**: 273–285.
- Werck-Reichhart, D., Bak, S., and Paquette, S.** (2002). Cytochromes p450. *Arab. B.* **1**: e0028.
- Werck-Reichhart, D. and Feyereisen, R.** (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* **1**: REVIEWS3003.
- Werck-Reichhart, D., Hehn, A., and Didierjean, L.** (2000). Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends Plant Sci.* **5**: 116–123.
- Winkel-Shirley, B.** (1999). Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiol. Plant.* **107**: 142–149.
- Winkel, B.S.J.** (2004). Metabolic channeling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 85–107.
- Wolf, L., Rizzini, L., Stracke, R., Ulm, R., and Rensing, S.A.** (2010). The molecular and physiological responses of *Physcomitrella patens* to ultraviolet-B radiation. *Plant Physiol.* **153**: 1123–34.
- Xu, Z. et al.** (2009). Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom. *BMC Bioinformatics* **10 Suppl 11**: S3.
- Zhan, X., Zhang, Y.-H., Chen, D.-F., and Simonsen, H.T.** (2014). Metabolic engineering of the moss *Physcomitrella patens* to produce the sesquiterpenoids patchoulol and α/β -santalene. *Front. Plant Sci.* **5**: 636.
- Zhang, C., Hicks, G.R., and Raikhel, N. V** (2015). Molecular Composition of Plant Vacuoles: Important but Less Understood Regulations and Roles of Tonoplast Lipids. *Plants (Basel, Switzerland)* **4**: 320–33.
- Zhao, J., Davis, L.C., and Verpoorte, R.** (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* **23**: 283–333.
- Zhong, R. and Ye, Z.-H.** (2009). Transcriptional regulation of lignin biosynthesis. *Plant Signal. Behav.* **4**: 1028–34.

Trois publications les plus significatives

Characterization of a dynamic metabolon producing the defense compound dhurrin in sorghum. (2016) T Laursen, J Borch, C Knudsen, K Bavishi, F Torta, HJ Martens, D Silvestro, NS Hatzakis, MR Wenk, TR Dafforn, CE Olsen, MS Motawia, BR Hamberger, BL Møller, **J-E Bassard**. *Science*. 354: 890-893.

Protein-protein and protein-membrane associations in the lignin pathway from Arabidopsis thaliana. (2012) **J-E Bassard**, L Richert, J Geerinck, H Renault, F Duval, P Ullmann, M Schmitt, E Meyer, J Mutterer, W Boerjan, G De Jaeger, Y Mely, A Goossens and D Werck-Reichhart. *Plant Cell*. 24(11): 4465-4482.

Plasticity of specialized metabolism as mediated by dynamic metabolons. (2015) T Laursen, BL Møller, **J-E Bassard**. *Trends in Plant Science*. 20(1): 20-32.

PLANT SCIENCE

Characterization of a dynamic metabolon producing the defense compound dhurrin in sorghum

Tomas Laursen,^{1,2,3,4,5} Jonas Borch,^{2,6} Camilla Knudsen,^{1,2,3,4} Krutika Bavishi,^{1,2,3,4} Federico Torta,⁷ Helle Juel Martens,⁴ Daniele Silvestro,⁴ Nikos S. Hatzakis,^{2,8} Markus R. Wenk,^{7,9} Timothy R. Dafforn,^{10,11} Carl Erik Olsen,^{1,2,3} Mohammed Saddik Motawia,^{1,2,3,4} Björn Hamberger,^{1,2} Birger Lindberg Møller,^{1,2,3,4,12*} Jean-Etienne Bassard^{1,2,3,4*}

Metabolic highways may be orchestrated by the assembly of sequential enzymes into protein complexes, or metabolons, to facilitate efficient channeling of intermediates and to prevent undesired metabolic cross-talk while maintaining metabolic flexibility. Here we report the isolation of the dynamic metabolon that catalyzes the formation of the cyanogenic glucoside dhurrin, a defense compound produced in sorghum plants. The metabolon was reconstituted in liposomes, which demonstrated the importance of membrane surface charge and the presence of the glucosyltransferase for metabolic channeling. We used in planta fluorescence lifetime imaging microscopy and fluorescence correlation spectroscopy to study functional and structural characteristics of the metabolon. Understanding the regulation of biosynthetic metabolons offers opportunities to optimize synthetic biology approaches for efficient production of high-value products in heterologous hosts.

Plants produce a plethora of specialized metabolites to fend off attack from herbivores and pests and to adapt to abiotic stresses. One class of specialized metabolites is the cyanogenic glucosides, such as dhurrin, which is present in *Sorghum bicolor* (*1*). Dhurrin is produced from the amino acid L-tyrosine and synthesized by three membrane-anchored proteins—the NADPH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)-dependent cytochrome P450 oxidoreductase (POR) and two cytochrome P450 enzymes (CYP79A1 and CYP71E1)—and by a soluble UDP (uridine diphosphate)-glucosyltransferase (UGT85B1) (*2*) (Fig. 1A). When cellular integrity is disrupted, such as by a chewing insect, dhurrin is hydrolyzed, which results in the release of toxic hydrogen cyanide (Fig. 1A) (*1*).

The dhurrin content of 3-day-old etiolated seedlings reaches 30% of their dry weight (*3*), even though the enzymes involved in dhurrin biosynthesis constitute less than 1% of the total membrane protein content (*4*). This efficiency may be governed by metabolon formation. Metabolon disassembly would result in the release of an aldoxime intermediate, which has been proposed to act as an antifungal agent (*5*). Several biosynthetic pathways have been proposed to involve the formation of metabolons, which are often depicted as static entities composed of equimolar protein components (*2, 6–8*). Here we report protein-protein interactions (including oligomer formation), protein dynamics, and functional regulation of the metabolon that catalyzes dhurrin synthesis.

The isolation of dynamic membrane-embedded metabolons is hampered by their destabilization and dissociation upon detergent solubilization of the lipid bilayer. The use of the styrene maleic acid (SMA) copolymer circumvents these issues. The SMA polymer spontaneously integrates into the lipid bilayer and carves out discrete lipid particles (SMALPs) containing the resident membrane proteins and the surrounding lipids (*9*). We used the SMALP technology in combination with affinity chromatography to isolate the dynamic dhurrin metabolon (fig. S1).

Application of the SMA polymer to microsomes prepared from etiolated sorghum seedlings resulted in the formation of discrete SMALPs ranging from 10 to 25 nm in diameter ($n = 242$) (Fig. 1B). These particles were larger than previously reported SMA particles obtained from pure lipids or harboring a single protein (10 nm on average) (*9*). POR is the common electron donor to all microsomal P450s (*10*). The SMALPs were purified by 2',5'ADP (adenosine diphosphate)-

Sephacryl affinity chromatography, based on the NADPH cofactor requirement of POR, for copurification of POR-associated proteins (fig. S2). We analyzed the protein content in the course of SMALP purification by quantitative mass spectrometry (Fig. 1C, fig. S3, and data S1 and S2) (*11*). As a control, the same purification was carried out using the anionic detergent cholate instead of the SMA polymer. The protein enrichment was determined on the basis of the content of the three POR isoforms (POR2a to -c), the P450 proteins, and other enzymes including UGT85B1, dhurrinase, cytochrome b₅ (Cytb₅), and Cytb₅ reductase (table S1). Microsomal and SMA-solubilized fractions had similar protein content (fig. S3). After affinity chromatography, 132 proteins were quantified in the SMALPs, with the P450s CYP79A1 and CYP71E1 among the eight most abundant proteins (Fig. 1C). In contrast, no P450 enrichment was observed in the cholate sample (table S1). The soluble UGT85B1 was identified in all samples but could not be quantified in the purified SMALP sample, most likely because of the extensive washing steps during microsome preparation and affinity chromatography. The strong enrichment of the entire complement of membrane-bound dhurrin pathway enzymes in the affinity-purified SMALPs demonstrates that these enzymes are assembled in a metabolon.

Functional regulation of dhurrin biosynthesis as a response to environmental stresses (*1*) likely involves dynamic assembly and disassembly of the metabolon. Therefore, we studied the effect of UGT85B1 on the channeling of L-tyrosine toward dhurrin by in vitro reconstitution of the dhurrin enzymes in liposomes. Catalytic activities of P450s were determined based on the amounts of aldoxime (CYP79A1-mediated) and cyanohydrin (CYP71E1-mediated) produced after administration of radiolabeled L-tyrosine substrate (Fig. 2A). In the absence of UGT85B1, 50% of the produced aldoxime was further converted into the cyanohydrin, corresponding to a catalytic rate constant for CYP79A1 ($k_{\text{cat}}^{\text{CYP79A1}}$) of 80 min⁻¹ and a $k_{\text{cat}}^{\text{CYP71E1}}$ of 40 min⁻¹. When supplemented with UGT85B1 in the absence of UDP-glucose, UGT85B1 interacted with the two P450s (fig. S4), increasing their catalytic properties ($k_{\text{cat}}^{\text{CYP79A1}} = 100 \text{ min}^{-1}$ and $k_{\text{cat}}^{\text{CYP71E1}} = 80 \text{ min}^{-1}$) and thus demonstrating an increased flux of L-tyrosine through the P450s and improved channeling (80%; Fig. 2A). Addition of UDP-glucose did not further increase the catalytic efficiency of the two P450s or the channeling of the aldoxime. Additionally, UGT85B1 did not stimulate CYP71E1 activity, as observed by administration of aldoxime as a substrate (Fig. 2A). Therefore, we propose that UGT85B1 binds specifically to both P450s and augments the flux and channeling of L-tyrosine toward dhurrin.

The impact of membrane lipid composition on the catalytic activities of the dhurrin pathway P450s was examined by reconstitution experiments in liposomes, using different ratios of phospholipids based on the enrichment observed in the purified SMALP samples (fig. S5 and data S3 to S5). CYP79A1 activity was marginally influenced by the phospholipid composition. In contrast, the

¹Plant Biochemistry Laboratory, Department of Plant and Environmental Science, University of Copenhagen, DK-1871 Frederiksberg C, Denmark. ²bioSYnergy, Center for Synthetic Biology, DK-1871 Frederiksberg C, Denmark. ³VILLUM Research Center for Plant Plasticity, DK-1871 Frederiksberg C, Denmark. ⁴Copenhagen Plant Science Center, University of Copenhagen, DK-1871 Frederiksberg C, Denmark. ⁵Feedstocks Division, Joint BioEnergy Institute, Emeryville, CA 94608, USA. ⁶VILLUM Center For Bioanalytical Sciences, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, DK-5230 Odense M, Denmark. ⁷Department of Biochemistry, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore 117597, Singapore. ⁸Department of Chemistry, Nano-Science Center, University of Copenhagen, DK-2100 Copenhagen, Denmark. ⁹Department of Biological Sciences, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore 117597, Singapore. ¹⁰School of Biosciences, University of Birmingham, Birmingham B15 2TT, UK. ¹¹Department of Business, Energy and Industrial Strategy, Her Majesty's Government, UK. ¹²Carlsberg Research Laboratory, DK-1799 Copenhagen V, Denmark. *Corresponding author. Email: blm@plen.ku.dk (B.L.M.); jbassard@outlook.com (J.-E.B.)

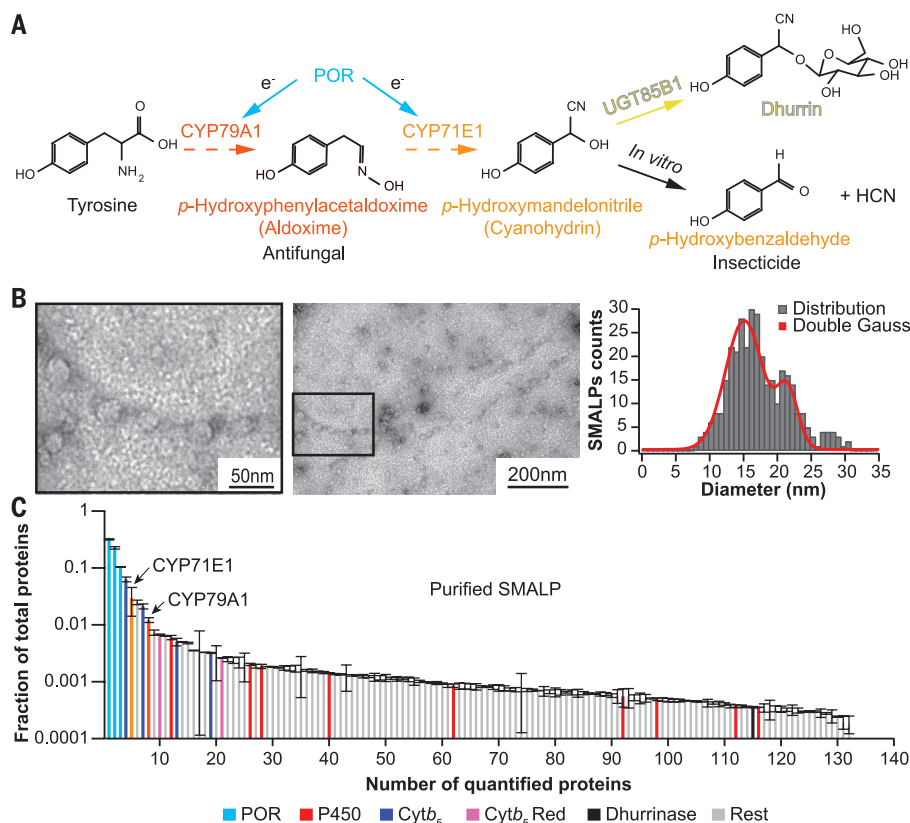


Fig. 1. Detergent-free isolation of the dhurrin metabolon, including the surrounding lipids. (A) The dhurrin biosynthetic pathway. HCN, hydrogen cyanide. (B) Negative-stain transmission electron microscopy images of affinity-purified SMALPs (left) and the distribution of particle sizes (right). (C) Quantitative mass spectrometry of the protein content of affinity-purified SMALPs. Proteins related to dhurrin biosynthesis and other P450 enzymes are highlighted. Data are represented as the fraction of the total protein content (mean values of three independent measurements \pm SD). Red, reductase.

catalytic efficiency of CYP71E1 was highly sensitive to the lipid environment and dependent on the total concentration of negative charges derived from the lipid headgroups of PG, PS, and PI, with an optimum efficiency in liposomes containing 20 to 30% negatively charged phospholipids (Fig. 2B). This matches the observed enrichment of PG in the purified SMALPs.

To study the organization of the dhurrin pathway enzymes in planta, we transiently expressed CYP79A1, CYP71E1, UGT85B1, POR2b, and different combinations of these (including control proteins) in *Nicotiana benthamiana* leaf epidermal cells (11), the most suitable plant expression system for in planta fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) and fluorescence correlation spectroscopy (FCS). The expression levels of the heterologous proteins in *N. benthamiana* were quantitatively comparable to those in *S. bicolor* seedlings (table S2 and data S6).

Upon coexpression of CYP79A1 and CYP71E1, several byproducts of the dhurrin pathway and some dhurrin accumulated (Fig. 3A). The formation of dhurrin reflects the inherent capability of *N. benthamiana* to glycosylate exogenous compounds (12). Coexpression of UGT85B1 with the two P450s and without *S. bicolor* POR2b resulted in the accumulation of 263% more dhurrin and a reduction of byproduct release to 9% of the level observed in the absence of UGT85B1 (table S3). The efficient channeling of intermediates achieved upon coexpression of UGT85B1 supports the assembly of a metabolon in planta and confirms that endogenous *N. benthamiana* POR is sufficient to provide reducing equivalents to the P450s.

To further evaluate dhurrin metabolon formation, we expressed CYP79A1, CYP71E1, UGT85B1, and POR2b as fusion proteins with different fluorescent proteins suitable for in planta FLIM and FCS (figs. S6 to S8) (11). First, the functionality of the target enzymes after fusion was assessed. All possible combinations with enhanced green fluorescent protein (eGFP) fused to two of the three target proteins produced similar amounts of dhurrin and byproducts (Fig. 3A and table S3). No apparent difference between the use of N- and C-terminally tagged UGT85B1 was observed, and here we present only the data obtained for N-terminal fusion constructs. The tracking of fluorescent fusion constructs of the dhurrin enzymes with confocal microscopy techniques (movies S1 and S2) illustrated their fast movement in the plant cell along the endoplasmic reticulum (ER) network, as has also been observed in studies of other metabolons (7, 8, 13). Quantified by FCS, the average diffusion coefficients of individual dhurrin enzymes decreased upon coexpression of the two other partners, whereas the diffusion of the POR2b:eGFP fusion protein was not influenced by coexpression of dhurrin enzymes (Fig. 3, B and C; fig. S9; and tables S4 and S5).

The fluorescence (Förster) resonance energy transfer (FRET) efficiencies for pairwise combinations of all target fluorescent fusion proteins were calculated to gain a more detailed knowledge of the organization of the dhurrin metabolon (fig. S10). The in planta FRET results demonstrated that

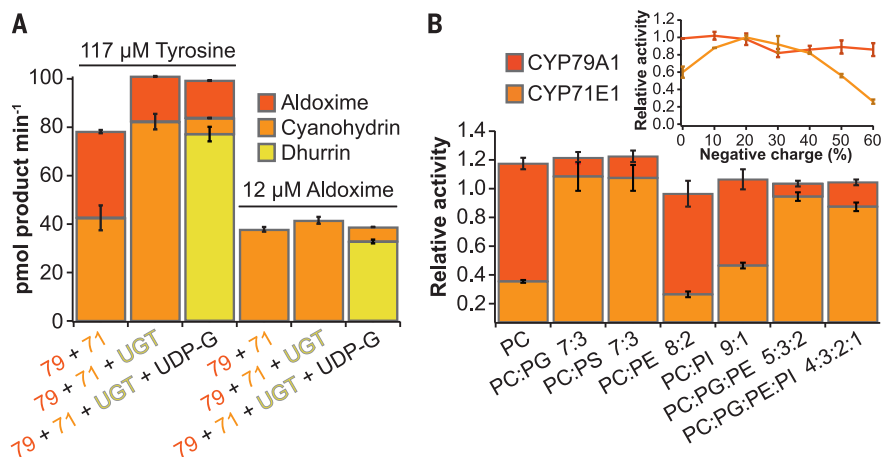


Fig. 2. Protein-protein and protein-lipid interactions stimulate channeling. (A) POR2b, CYP79A1, and CYP71E1 were reconstituted in liposomes from a total lipid extract from sorghum microsomes. The catalytic activity of CYP79A1 ("79") and CYP71E1 ("71") was measured in the absence of or after supplementation with UGT85B1 ("UGT") and/or UDP-glucose ("UDP-G"), using radiolabeled L-tyrosine or aldoxime as the substrate. (B) POR2b, CYP79A1, and CYP71E1 were reconstituted in liposomes with different lipid mixtures of POPC, POPG, POPS, POPE, and PI. The catalytic activity of CYP79A1 and CYP71E1 was measured and compared with that measured in (A) (relative activity). The inset shows the relative catalytic activity for a titration of PG lipids and P450 activities. All functional data are averages of biological triplicates, and error bars indicate \pm SD. PC, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine; PS, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine; PG, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol); PI, L- α -phosphatidylinositol; PE, 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine.

Fig. 3. Functional fluorescence labeling of dhurrin biosynthetic enzymes and control proteins for in planta studies. (A) Liquid chromatography–mass spectrometry data for dhurrin biosynthesis in *N. benthamiana* upon expression of CYP79A1, CYP71E1, and UGT85B1. Metabolite profiles were monitored as total ion chromatograms (TICs). Peaks 1 to 6 are byproducts of dhurrin intermediates. Prunasin was used as a primary internal standard and amygdalin as a secondary internal standard. The combination of CYP79A1 and CYP71E1 (“79 + 71”) was used as a reference (100%) for the total level of accumulated byproducts. (B) Apparent diffusion of eGFP-labeled soluble proteins and (C) ER proteins measured by in planta FCS onto ER. CYP98A1:eGFP and free eGFP were used as controls. The CYP98 family of P450 enzymes belongs to the CYP71 clan, like CYP79A1 and CYP71E1. CYP98 catalyzes the introduction of hydroxyl groups at the meta position of phenylpropanoid-derived esters and was chosen as a control because it is not involved in dhurrin metabolism. Letters indicate statistically significant similarities for the recorded values, based on *t* test pairwise comparisons with *P* < 0.05. Error bars indicate ±SD.

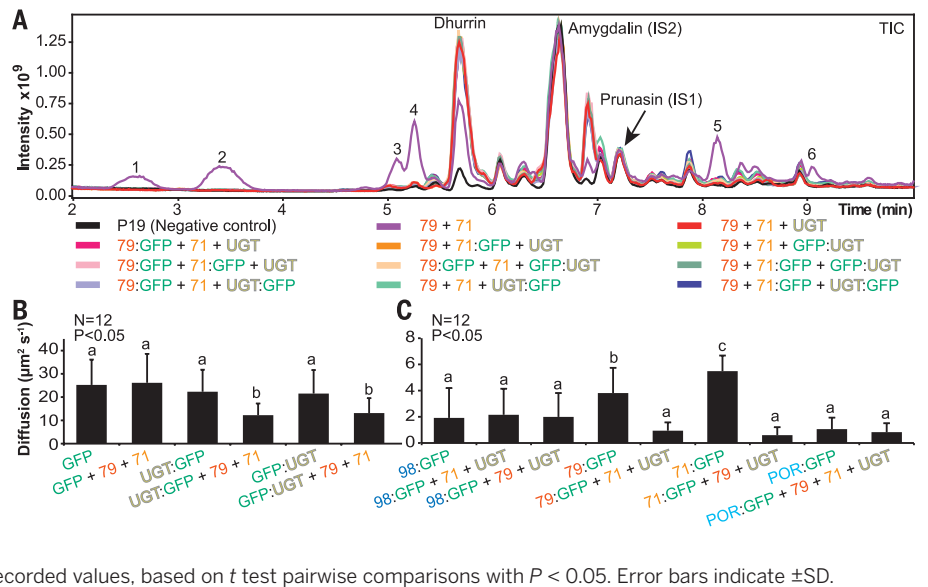
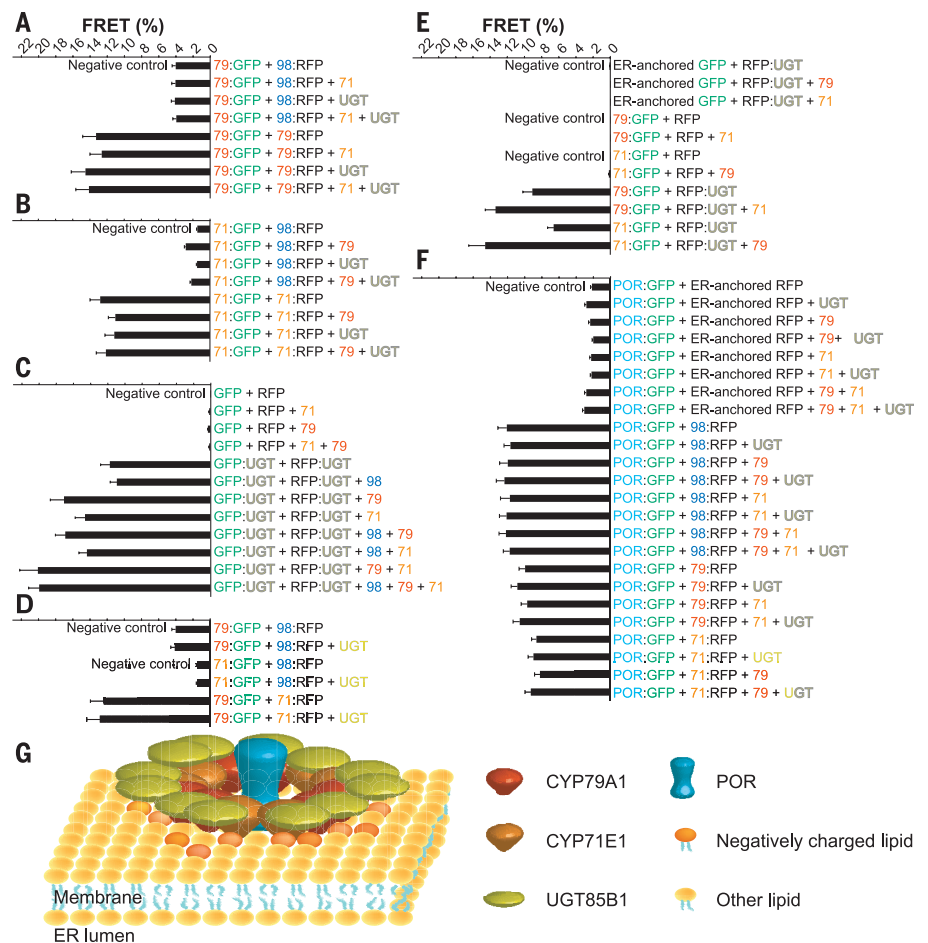


Fig. 4. Protein-protein interactions in planta reveal formation of multienzyme clusters. Pairwise protein association of the dhurrin enzymes was monitored in *N. benthamiana* by FLIM with eGFP- and mRFP1 (monomeric red fluorescent protein 1)-labeled proteins. FRET percentages reflecting the proximity and the frequency of association between protein constructs were calculated from the recorded eGFP lifetime. Error bars indicate ±SD. The effect of coexpression of the third dhurrin enzyme was determined by FRET measurements between the combinations (A) CYP79A1-CYP79A1, (B) CYP71E1-CYP71E1, (C) UGT85B1-UGT85B1, (D) CYP79A1-CYP71E1, (E) CYP79A1-UGT85B1 and CYP71E1-UGT85B1, and (F) POR2b-P450. (G) Model of the dhurrin metabolon involving higher-order clusters and enrichment of negatively charged phospholipids.



CYP79A1, CYP71E1, and UGT85B1 all form homo- and hetero-oligomers with FRET values higher than those of the controls (Fig. 4, A to E, and tables S6 to S10). FRET signals for CYP79A1-

CYP79A1, CYP71E1-CYP71E1, and CYP79A1-CYP71E1 complexes were unaffected by coexpression of UGT85B1. In contrast, UGT85B1-UGT85B1 oligomerization was enhanced by coexpression of

either CYP79A1 or CYP71E1, with the highest FRET signal observed when the entire dhurrin pathway was expressed, suggesting recruitment of UGT85B1 by the P450s (Fig. 4C). We therefore

conclude that the soluble UGT85B1 interacts with both CYP79A1 and CYP71E1, but that it is not necessary for CYP79A1-CYP71E1 complex formation (Fig. 4E). CYP79A1, CYP71E1, CYP98A1, and POR2b are situated very close together at the ER surface and have comparable pairwise FRET values (Fig. 4F and table S11). All microsomal P450s require electron donation from POR; therefore, it is not surprising that CYP98A1 is proximal to the dhurrin biosynthetic enzymes (Fig. 4, A, B, and D). UGT85B1 was situated close to the nonpartner ER membrane proteins, CYP98A1 and POR2b, when CYP79A1 and CYP71E1 were coexpressed (table S12).

A prerequisite to understanding how cells coordinate diverse metabolic activities is to understand how the enzyme systems catalyzing these reactions are organized and their possible enrollment as part of dynamic metabolons. Efforts to maximize product yield from genetically engineered pathways (14–17) would benefit from this information. In this study, we showed that the dhurrin pathway forms an efficient metabolon. CYP79A1 and CYP71E1 form homo- and hetero-oligomers, which enable recruitment of the cytosolic soluble UGT85B1 (Fig. 4G). UGT85B1 regulates the flux of L-tyrosine and stimulates channeling between CYP79A1 and CYP71E1. Efficient metabolic flux and channeling require an overall negatively charged lipid surface and may provide an additional means for regulating the dynamic assembly necessary to respond swiftly to environmental challenges. A similar organization may characterize the biosynthetic pathways of other specialized metabolites as well.

REFERENCES AND NOTES

1. R. M. Gleadow, B. L. Møller, *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**, 155–185 (2014).
2. T. Laursen, B. L. Møller, J. E. Bassard, *Trends Plant Sci.* **20**, 20–32 (2015).
3. B. A. Halkier, B. L. Møller, *Plant Physiol.* **90**, 1552–1559 (1989).
4. O. Sibbesen, B. Koch, B. A. Halkier, B. L. Møller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 9740–9744 (1994).
5. B. L. Møller, *Science* **330**, 1328–1329 (2010).
6. K. Jørgensen *et al.*, *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 280–291 (2005).
7. S. An, R. Kumar, E. D. Sheets, S. J. Benkovic, *Science* **320**, 103–106 (2008).
8. K. Mohr, E. Kostenis, *Nat. Chem. Biol.* **7**, 860–861 (2011).
9. S. C. Lee *et al.*, *Nat. Protoc.* **11**, 1149–1162 (2016).
10. T. Laursen *et al.*, *ACS Chem. Biol.* **9**, 630–634 (2014).
11. Materials and methods are available as supplementary materials on Science Online.
12. H. M. Ting *et al.*, *New Phytol.* **199**, 352–366 (2013).
13. J. E. Bassard *et al.*, *Plant Cell* **24**, 4465–4482 (2012).
14. I. Wheeldon *et al.*, *Nat. Chem.* **8**, 299–309 (2016).
15. C. Singleton, T. P. Howard, N. Smirnov, *J. Exp. Bot.* **65**, 1947–1954 (2014).
16. G. Farré *et al.*, *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**, 187–223 (2014).
17. J. E. Dueber *et al.*, *Nat. Biotechnol.* **27**, 753–759 (2009).

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the VILLUM Research Center for Plant Plasticity; by the bioSYNergy program of Center for Synthetic Biology (University of Copenhagen Excellence Program for Interdisciplinary Research); by a European Research Council Advanced Grant to B.L.M. (ERC-2012-ADG_20120314); and by funding from the VILLUM Foundation Young Investigator Programme to N.S.H. T.L. is recipient of a fellowship awarded by the VILLUM Foundation (project no. 95-300-73023). K.B. was supported by the P4FIFTY Marie Curie Initial Training Network (European Union's 7th Framework Programme). D.S. acknowledges funding from Innovation Fund Denmark (project no. 001-2011-4).

F.T. and M.R.W. were supported by grants from the National Research Foundation of Singapore (NRF12015-05) and a Biomedical Research Council–Science and Engineering Research Council joint grant (112 148 0006) from the Singapore Agency for Science, Technology and Research. T.R.D. acknowledges Biological and Biotechnology Science Research Council grants (BB/J017310/1 and BB/K004441/1). Imaging data were collected at the Center for Advanced Bioimaging, University of Copenhagen. We thank B. A. Halkier, C. Martin, A. Schulz, D. Werck-Reichhart, and anonymous reviewers for critical review of this manuscript. The supplementary materials contain additional data.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencemag.org/content/354/6314/890/suppl/DC1
Materials and Methods
Figs. S1 to S10
Tables S1 to S14
References (18–30)
Movies S1 and S2
Data S1 to S6

27 May 2016; accepted 4 October 2016
10.1126/science.aag2347

Characterization of a dynamic metabolon producing the defense compound dhurrin in sorghum

Tomas Laursen, Jonas Borch, Camilla Knudsen, Krutika Bavishi, Federico Torta, Helle Juel Martens, Daniele Silvestro, Nikos S. Hatzakis, Markus R. Wenk, Timothy R. Dafforn, Carl Erik Olsen, Mohammed Saddik Motawia, Björn Hamberger, Birger Lindberg Møller and Jean-Etienne Bassard

Science **354** (6314), 890-893.
DOI: 10.1126/science.aag2347

Metabolite channeling by a dynamic metabolon

The specialized metabolite dhurrin breaks down into cyanide when plant cell walls have been chewed, deterring insect pests. Laursen *et al.* found that the enzymes that synthesize dhurrin in sorghum assemble as a metabolon in lipid membranes (see the Perspective by Dsatmaichi and Facchini). The dynamic nature of metabolon assembly and disassembly provides dhurrin on an as-needed basis. Membrane-anchored cytochrome P450s cooperated with a soluble glucosyltransferase to channel intermediates toward efficient dhurrin production.

Science, this issue p. 890; see also p. 829

Protein–Protein and Protein–Membrane Associations in the Lignin Pathway^{WJ|OA}

Jean-Etienne Bassard,^a Ludovic Richert,^b Jan Geerinck,^c Hugues Renault,^a Frédéric Duval,^a Pascaline Ullmann,^a Martine Schmitt,^d Etienne Meyer,^a Jérôme Mutterer,^a Wout Boerjan,^c Geert De Jaeger,^c Yves Mely,^b Alain Goossens,^c and Danièle Werck-Reichhart^{a,1}

^aInstitute of Plant Molecular Biology of Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Propre de Recherche 2357, University of Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France

^bCentre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7213, University of Strasbourg, F-67401 Illkirch, France

^cDepartment of Plant Systems Biology, Vlaams Interuniversitair Instituut Voor Biotechnologie and Department of Plant Biotechnology and Bioinformatics, Ghent University, B-9052 Ghent, Belgium

^dLaboratoire d'Innovation Thérapeutique, Unité Mixte de Recherche 7200, Centre National de la Recherche Scientifique–University of Strasbourg, F-67401 Illkirch, France

Supramolecular organization of enzymes is proposed to orchestrate metabolic complexity and help channel intermediates in different pathways. Phenylpropanoid metabolism has to direct up to 30% of the carbon fixed by plants to the biosynthesis of lignin precursors. Effective coupling of the enzymes in the pathway thus seems to be required. Subcellular localization, mobility, protein–protein, and protein–membrane interactions of four consecutive enzymes around the main branch point leading to lignin precursors was investigated in leaf tissues of *Nicotiana benthamiana* and cells of *Arabidopsis thaliana*. CYP73A5 and CYP98A3, the two *Arabidopsis* cytochrome P450s (P450s) catalyzing *para*- and *meta*-hydroxylations of the phenolic ring of monolignols were found to colocalize in the endoplasmic reticulum (ER) and to form homo- and heteromers. They moved along with the fast remodeling plant ER, but their lateral diffusion on the ER surface was restricted, likely due to association with other ER proteins. The connecting soluble enzyme hydroxycinnamoyltransferase (HCT), was found partially associated with the ER. Both HCT and the 4-coumaroyl-CoA ligase relocalized closer to the membrane upon P450 expression. Fluorescence lifetime imaging microscopy supports P450 colocalization and interaction with the soluble proteins, enhanced by the expression of the partner proteins. Protein relocalization was further enhanced in tissues undergoing wound repair. CYP98A3 was the most effective in driving protein association.

INTRODUCTION

Metabolons have been defined as supramolecular complexes of sequential metabolic enzymes and cellular structural elements (Srere, 1985). This organization of metabolic pathways at the molecular level is expected to have several advantages, such as increasing local concentrations of the enzymes and their substrates, sequestering reactive toxic intermediates, and improving channeling of intermediates between consecutive enzymes (Jørgensen et al., 2005; Ralston and Yu, 2006).

Protein association was proposed to support the formation of the huge diversity of plant natural products by a limited number of enzymes, some of which have broad substrate specificity. Formation of a metabolon is expected to be controlled by the availability of its constituents to match developmental and environmental requirements. It might be further favored by a local membrane composition or local solvent environment that may

favor protein and substrate colocalization via extraction from a cytosolic aqueous phase (Choi et al., 2011). According to the latter hypothesis, colocalization may result from the concentration of proteins in microdomains rather than from specific interactions.

In the case of plant secondary metabolism, membrane-bound proteins, in particular cytochrome P450 enzymes, were proposed to serve for nucleation of metabolons (Jørgensen et al., 2005; Ralston and Yu, 2006). P450 enzymes are usually anchored via their N terminus on the cytoplasmic surface of the endoplasmic reticulum (ER) with the main protein fold protruding on the surface of the membrane (Bayburt and Sligar, 2002). Mobility of P450s is thus restricted to two dimensions. They can be associated with membrane domains of specific lipid composition or membrane-structuring proteins. Recently, some evidence for the formation of drug-metabolizing complexes involving P450 enzymes in the mouse liver has been reported (Li et al., 2011). P450 anchoring of plant metabolons has also found support in flavonoid and cyanogenic glucoside metabolism (Winkel, 2004; Jørgensen et al., 2005), but the best documented example is at the entry of the phenylpropanoid pathway (reviewed in Ralston and Yu, 2006).

Phenylpropanoid metabolism (Figure 1) mobilizes up to 30% of the carbon fixed by photosynthesis for the synthesis of biopolymers in woody plants. It also provides precursors of soluble

¹ Address correspondence to danièle.werck@ibmp-cnrs.unistra.fr. The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Danièle Werck-Reichhart (danièle.werck@ibmp-cnrs.unistra.fr).

^{WJ} Online version contains Web-only data.

^{OA} Open Access articles can be viewed online without a subscription. www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.112.102566

metabolites for UV screening, defense, and communication with other organisms. Such soluble compounds accumulate to high levels in leaf tissues (Vogt, 2010). Gene expression is tightly coordinated in each branch of the pathway. The upstream core segment involves one P450 and two soluble proteins, the Phe ammonia lyase (PAL) that converts Phe into cinnamic acid, the P450 cinnamate 4-hydroxylase (C4H), CYP73A5 in *Arabidopsis thaliana* that forms *p*-coumaric acid, and the 4-coumaric acid CoA ligase (4-CL) that generates 4-coumaroyl CoA. This activated CoA ester is then distributed into a number of branch pathways, leading to the formation of flavonoids, coumarins, phenolic esters, amides, and monolignols, to which the main flux is directed in lignified cells. In *Arabidopsis*, 4-CL is encoded by four paralogs (Hamberger and Hahlbrock, 2004; Costa et al., 2005). Given its strong expression in stem and root and high catalytic efficiency for conversion of *p*-coumaric acid into its CoA ester (Ehltig et al., 1999; Costa et al., 2005), 4-CL1 was proposed to be the best candidate to drive the flux of metabolites into monolignols. Nonetheless, contribution of other paralogs, in particular 4-CL2, cannot be excluded. CYP98A3 is the *p*-coumaroylshikimate 3'-hydroxylase (C3'H), with a more restricted commitment to lignin synthesis. Its direct upstream and downstream partner is the hydroxycinnamoyl CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase (HCT) that reversibly converts hydroxycinnamoyl CoA into hydroxycinnamoyl shikimate. Together, C3'H and HCT form a loop sequence at the branch point to lignin synthesis (Schoch et al., 2001; Hoffmann et al., 2004). The two enzymes seem to be tightly coupled since shikimate derivatives never accumulate to UV-detectable levels in wild-type nor in C3'H-null mutant plants (Schoch et al., 2006).

The first evidence of metabolic channeling in the phenylpropanoid pathway was reported for the PAL-C4H couple. Czichi and Kindl (1975, 1977) detected a partial association of PAL with a purified microsomal fraction from potato tuber. This fraction was found to convert Phe more efficiently than exogenously supplied cinnamate into *p*-coumaric acid, which supported a channeling hypothesis. Further work differentiated the behavior of PAL1 and PAL2 in tobacco (*Nicotiana tabacum*), where PAL1, but not PAL2, was found to localize to the ER (Rasmussen and Dixon, 1999). In tobacco cell cultures and microsomal membranes, exogenous radiolabeled cinnamate did not equilibrate with the pool of cinnamate directly produced from PAL. Both green fluorescent protein (GFP)-tagged PALs were partially relocalized to the ER upon C4H overexpression (Achnine et al., 2004), and competition experiments supported stronger affinity of PAL1 for ER binding sites. Colocalization with C4H was confirmed by double immunolabeling and fluorescence resonance energy transfer (FRET), although data were indicative of loose interaction. PAL1 localization near the ER membrane was more recently confirmed in *Nicotiana benthamiana* (Bassard et al., 2012). Despite the fact that these data converge, channeling between poplar (*Populus trichocarpa*) PAL and C4H could not be confirmed in yeast (Ro and Douglas, 2004). 4-CL is expected to be the downstream partner of C4H. So far, the only experimental indication for the participation of 4-CL in a protein complex is the detection of activity in the membrane-associated enzyme aggregates isolated by gel filtration reported by Hrazdina and Wagner (1985). Recently, Chen

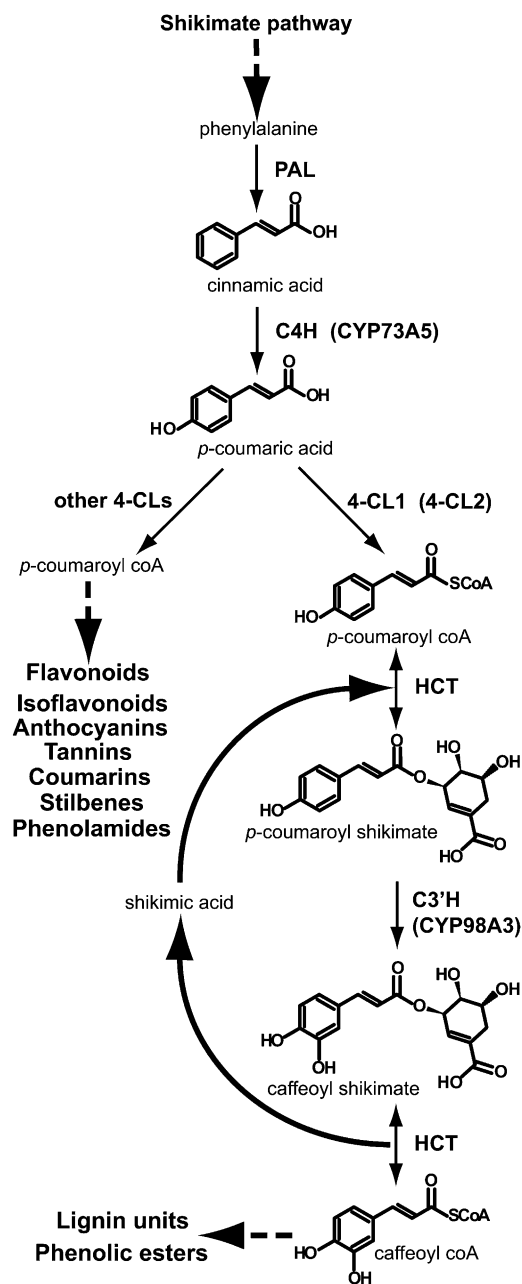


Figure 1. Lignin Branch Point of Phenolic Metabolism.

Dashed arrows indicate multistep reactions.

et al. (2011) also reported interaction between poplar C4H and C3'H, which positively affects the activity of both proteins.

The aim of this work was to investigate protein–membrane and protein–protein association at the entry point of the lignin pathway with a main focus on *Arabidopsis* HCT and C3'H in a plant cellular environment. Our data point to fast P450 streaming with the ER membranes and hampered lateral diffusion on the surface of the ER. We show P450 aggregation into homomers and heteromers in vivo and binding to other membrane constituents, such as reticulons. Partial ER association

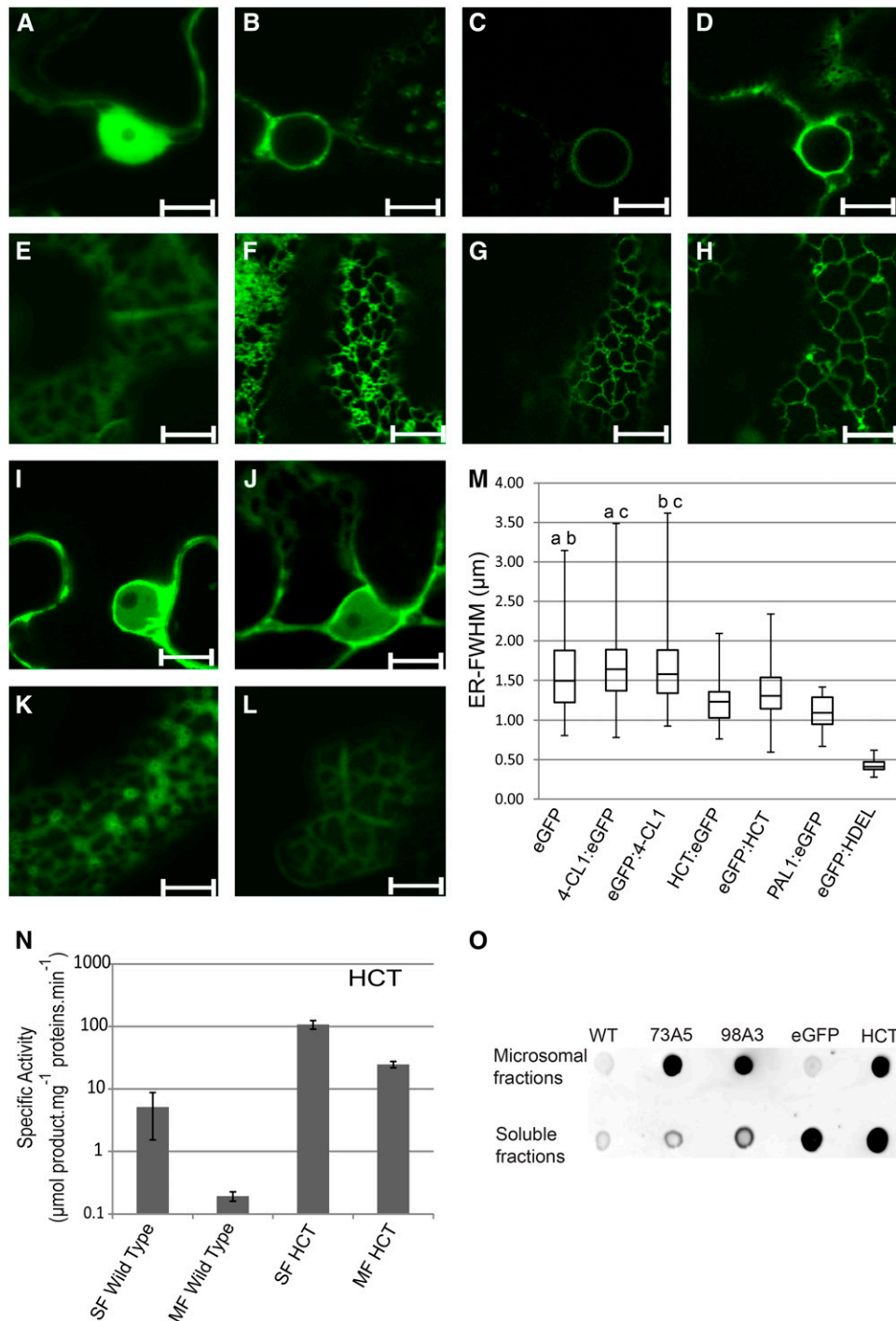


Figure 2. Subcellular Localization of 4-CL1, HCT, CYP73A5, and CYP98A3.

Confocal images, microsomes, and soluble fractions were collected 5 d after agroinfiltration of the *N. benthamiana* leaves.

(A) to (L) Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) images of the nucleus (A) to (D), (I), and (J) and parietal ER (E) to (H), (K), and (L) of leaves expressing eGFP (A) and (E), eGFP:HDEL (B) and (F), CYP73A5:eGFP (C) and (G), CYP98A3:eGFP (D) and (H), 4-CL1:eGFP (I) and (K), or HCT:eGFP (J) and (L). Soluble enzymes diffuse into the nucleus and fill in gaps between organelles and plasma membranes. ER proteins are confined to nuclear membranes and to a well-defined membrane network. 4-CL1:eGFP and HCT:eGFP localization usually appears less diffuse than eGFP on confocal images. Latrunculin B (20 μM) was used to stop the movement of the ER. Similar images were obtained with mRFP1 fusion constructs or N-terminal fluorescent fusion constructs for HCT and 4-CL1. Bars = 10 μm .

and relocalization of the soluble proteins in the presence of P450 proteins is detected. Finally, our data indicate potential interaction of P450 and soluble proteins, enhanced by the other partner proteins. The CYP98A3/HCT couple appears most closely associated and seems to enhance further protein association.

RESULTS

CYP98A3 and CYP73A5 Are Mobile with and within the ER

Based on data from animal systems, P450s are pictured as proteins with free lateral mobility in a slowly remodeling ER (Szczena-Skorupa et al., 1998). To test if this applies to plant enzymes, CYP73A5 and CYP98A3 were expressed as enhanced GFP (eGFP) fusion proteins in plant membranes by transfection of *N. benthamiana* leaves. Since these P450s are anchored to the ER through an N-terminal signal peptide, they were eGFP tagged at the C terminus. Both CYP73A5 and CYP98A3 behaved as typical ER proteins when compared with free and ER-retained eGFP (Figures 2A to 2H). Determination of C4H and C3'H activities in the microsomal membranes of transformed leaves indicated that the NADPH:cytochrome P450 reductase (CPR) from *N. benthamiana* successfully reduced the P450 enzymes from *Arabidopsis*. Based on relative activities detected in microsomes from leaves expressing the native and tagged proteins, eGFP tagging caused 57 and 65% reduction in enzyme activity for CYP73A5 and CYP98A3, respectively (see Supplemental Table 1 online). The presence of the eGFP tag at the C terminus is expected to produce a steric hindrance for P450 interaction with its electron donor CPR, since the C terminus and P450 regions involved in electron transfer (Sevrioukova et al., 1999; Jensen et al., 2011) are located on the same face of the P450 protein. However, the near 40% residual activity of the tagged enzymes indicates that the presence of the eGFP does not completely prevent the P450–CPR interaction.

The plant ER is described as being very dynamic and constantly remodeling (Griffing, 2010; Sparkes et al., 2011). Time-lapse imaging of CYP73A5 and CYP98A3 as eGFP-fused proteins (see CYP98A3 in Figure 3 and Supplemental Movie 1 online) illustrates their fast movement in the plant cell together with the ER network. The samples were then treated with the actin-depolymerizing agent Latrunculin B that limits movement

to diffusion but preserves the ER structure (Coué et al., 1987; Runions et al., 2006; Griffing, 2010). Lamellar ER regions were then selected for fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments to evaluate lateral protein diffusion on the surface of the ER. Figure 4 compares bleaching and recovery recorded with plant leaves expressing free and ER-retained eGFP, P450:eGFP, 4-CL1:eGFP, and HCT:eGFP constructs. Bleaching was close to 20%, and recovery was nearly complete within 90 s for eGFP-HDEL (Figure 4A). Bleaching was above 40% and recovery very low and limited for both P450:eGFP constructs (Figures 4B and 4C; see Supplemental Figure 1 online). No bleaching was observed for soluble free eGFP, nor for 4-CL1:eGFP and HCT:eGFP (Figures 4D to 4F). The lateral diffusion of both CYP98A3 and CYP73A5 enzymes on the surface of the ER appears thus restricted, either due to supramolecular organization or the anchoring on a membrane or cytoskeleton component.

CYP98A3 and CYP73A5 Interact with Other ER-Resident Proteins

To investigate interaction of CYP98A3 and CYP73A5 with other membrane proteins, both of them were used as baits in tandem affinity purification (TAP) experiments performed with P450s that were C-terminally tagged with the protein G - Streptavidin (GS) tag (Bürckstümmer et al., 2006) and expressed in *Arabidopsis* cell suspension cultures (Van Leene et al., 2007). TAP tagging was performed in cells grown under standard conditions and under conditions inducing differentiation to tracheary elements and secondary wall deposition, which enhances expression of the lignin pathway (Oda et al., 2005). Using CYP98A3 as bait, CYP73A5 was copurified two times in three independent TAP experiments, and this occurred only under inducing conditions (Table 1; see Supplemental Data Set 1 online). Two other proteins, the P450 PHYTOALEXIN DEFICIENT3 (PAD3 or CYP71B15), reported to catalyze the final steps in camalexin synthesis (Schuhegger et al., 2006; Böttcher et al., 2009) and an esterase of unknown function (At5g22460) copurified with both CYP73A5 and CYP98A3 only under inducing conditions.

Furthermore, the NADH-cytochrome *b*₅ reductase (At5g53560), another P450, CYP706A1 (and/or its very close paralog CYP706A2), with as yet unknown activity, as well as a number of structural proteins copurified with both CYP73A5 and CYP98A3, but independent from the induction conditions. Among them were

Figure 2. (continued).

(M) Box plot representing the distribution of HCT, 4-CL1, eGFP, NtPAL1:eGFP, and eGFP:HDEL detected by CLSM around ER tubules evaluated by confocal microscopy based on confocal images such as those shown in **(E)**, **(F)**, **(K)**, and **(L)**. The box plot representation provides information on the distribution of a population of proteins near the membrane (median, maximum, and minimum distances, as well as first and third quartile). For each experimental condition, 100 measurements were randomly recorded from independent images. a, b, and c indicate pairs with similar distribution according to ANOVA analysis (see Supplemental Data Set 2 online). ER-FWHM, ER-full width at half maximum expressed in micrometers. The box plot shows the median distance and the protein located farther (above) or closer (below) to the membrane.

(N) HCT activities detected in the soluble fraction and associated with washed microsomal membranes. Specific activities are expressed in μmol of product per milligram of total proteins per minute. MF, microsomal fraction; SF, soluble fraction. Mean and *sd* (indicated by error bars) are determined from three independent experiments and three technical replicates. See Supplemental Table 1 online for details on eGFP-fusion enzyme activities.

(O) Dot blot of soluble fractions or microsomes from *N. benthamiana* plants expressing eGFP-tagged proteins detected by eGFP antibodies. WT, the wild type *N. benthamiana* (control); eGFP, eGFP alone (control); 73A5, CYP73A5:eGFP; 98A3, CYP98A3:eGFP; HCT, HCT:eGFP.

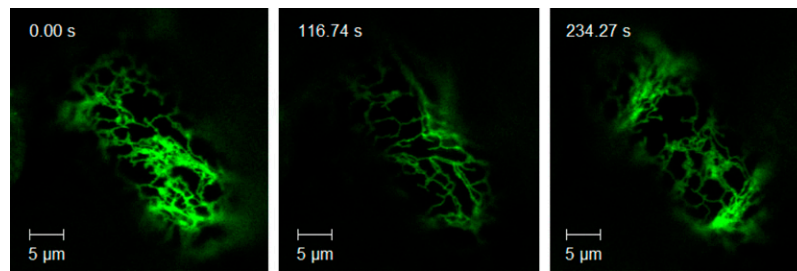


Figure 3. Mobility of CYP98A3 with the Plant ER.

Five days after agroinfiltration of *N. benthamiana* leaves with the CYP98A3:eGFP construct, movies of the GFP fluorescence were taken. Representative images from three times as indicated are shown. The full movie is available as Supplemental Movie 1 online. Movies showing the behavior of eGFP (soluble enzyme control) and eGFP:HDEL (ER protein control) are available for comparison as Supplemental Movies 2 and 3 online. Bar = 5 μm .

several members of the reticulon family that were shown to contribute to ER tubule shaping and to interact with ER resident proteins (Sparkes et al., 2010, 2011). Other CYP73A5/98A3 ligands included a band7 family protein that is the *Arabidopsis* homolog of the ER lipid raft-associated proteins (erlins) found associated with high molecular weight protein complexes in mammalian cells (Browman et al., 2006; Hoegg et al., 2009) and two proteins containing a C2-domain (At1g51570 and SYTA) that is thought to be involved in calcium-dependent phospholipid binding and in membrane targeting processes (Davletov

and Südhof, 1993). Finally, MEMBRANE STEROID BINDING PROTEIN1 (MSBP1) and MSBP2, a plant VAMP-associated protein (PVA12), and STEROL C24-METHYL TRANSFERASE2 (SMT2) interacted with both CYPs in all repeats and conditions. MSBP1 and MSBP2 can bind to progesterone, brassinolide, and stigmasterol with different affinities and presumably have a role in steroid signaling (Yang et al., 2005). PVA12 was demonstrated to be important for the ER localization of sterol binding proteins (Saravanan et al., 2009). SMT2 expression impacts sterol composition of the membrane (Schaeffer et al., 2001) and is

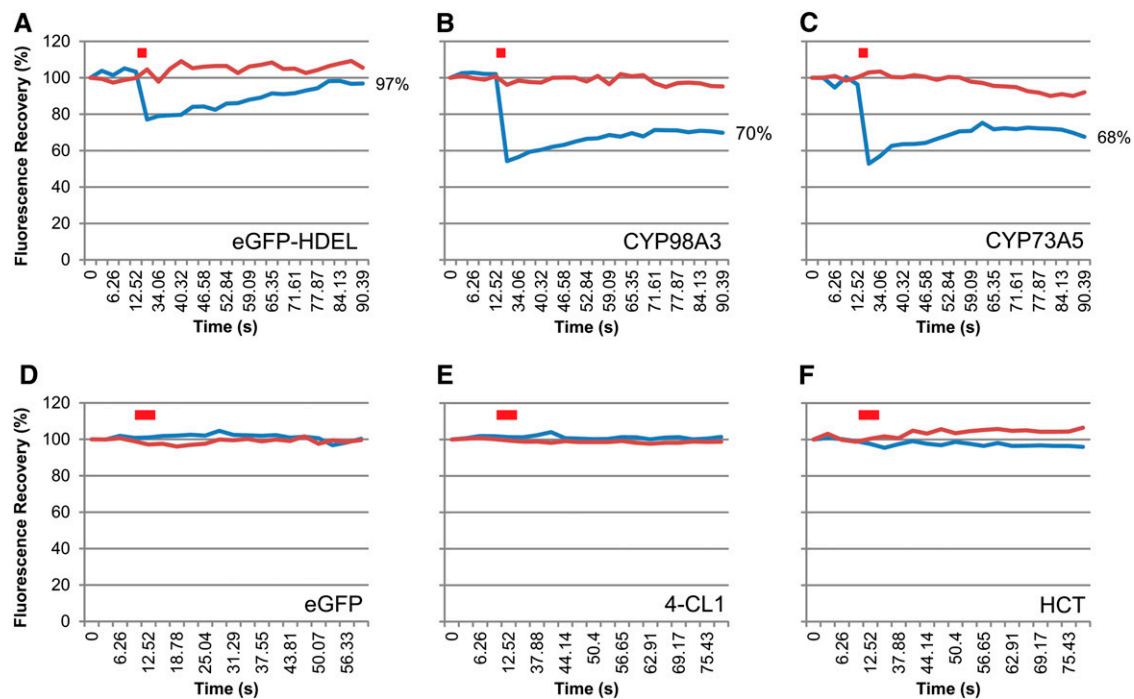


Figure 4. FRAP.

FRAP experiments were performed 5 d after agroinfiltration of *N. benthamiana* leaves with eGFP-HDEL (or ER-anchored eGFP) (A), CYP98A3:eGFP (B), CYP73A5:eGFP (C), eGFP (D), 4-CL1:eGFP (E), and HCT:eGFP (F) constructs. Latrunculin B (20 μM) was used to stop the movement of the ER tubules. Red bar indicates bleaching. Blue and red lines represent fluorescence recorded in bleached and control areas, respectively, for one representative experiment. See Supplemental Figure 1 for details about FRAP statistics.

Table 1. Interactors of CYP73A5 and CYP98A3 Determined by TAP Screens

Identified Proteins		Baits			
		CYP73A5		CYP98A3	
Accession No.	Prey Annotation	Induced	Noninduced	Induced	Noninduced
AT2G30490	CYP73A5	0	0	2	0
AT3G26830	PAD3	1	0	3	0
AT5G22460	Esterase/lipase/thioesterase family protein	1	0	3	0
AT4G22710/AT4G22690*	CYP706A2/CYP706A1	1	2	2	1
AT5G53560	Cytochrome b5 isoform 1	3	2	1	1
AT4G23630/AT4G11220*	Reticulon family protein (RTNLB1/RTNLB2)	2	2	3	1
AT1G64090	Reticulon family protein (RTNLB3)	0	1	2	1
AT5G41600	Reticulon family protein (RTNLB4)	0	2	2	0
AT2G46170	Reticulon family protein (RTNLB5)	0	1	2	0
AT2G03510	Band 7 family protein	1	1	3	0
AT1G51570	C2 domain-containing protein	2	0	1	2
AT2G20990	SYNAPTOTAGMIN A (SYTA)	0	1	0	2
AT1G20330	SMT2	3	2	3	2
AT5G52240	MSBP1	2	0	0	0
AT3G48890	MSBP2	2	1	0	0
AT2G45140	Vesicle-associated membrane protein (PVA12)	1	1	0	0
	Repeats	3	2	3	2

The left column shows all the proteins (accession no. and annotation) that copurified more than once with CYP73A5:GS and CYP98A3:GS expressed in *Arabidopsis* cell suspension cultures (PSB-D), either under induced or noninduced conditions for tracheary element and secondary wall formation. Numbers within the table indicate the number of positive results for each combination of prey/bait in three (for the induced condition) or two (for the noninduced condition) independent TAP experiments, respectively. Asterisk indicates that mass spectrometry cannot distinguish between these two isoforms because no specific peptides were generated. See Supplemental Data Set 1 online for MS identification of CYP73A5 and CYP98A3 interactors.

associated with vascular patterning (Carland et al., 2002). Erg6p, the yeast homolog of SMT2, has been shown to belong to an ER complex of sterol biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* (Mo et al., 2004; Mo and Bard, 2005).

A similar TAP experiment using as bait an unrelated P450 enzyme of unknown function (At1g13710; CYP78A5) did not identify any of the interactors in Table 1. Such a robust set of proteins interacting with both CYP73A5 and CYP98A3 thus supports the hypothesis of a specific membrane-anchoring complex limiting P450 mobility on the membrane surface.

HCT Is Partially Associated with the ER Membranes

4-CL1 and HCT are described as soluble proteins (Ehltng et al., 2001; Hoffmann et al., 2004). Their subcellular localization was compared with that of their membrane-bound partner P450s CYP73A5 and CYP98A3 in transfected *N. benthamiana*. 4-CL1 and HCT were expressed as both N-terminal and C-terminal eGFP fusions to allow all possible interactions with the membranes and membrane-bound proteins. eGFP tagging of the 4-CL1 or HCT did not hamper their catalytic activities indicating that the fusion proteins were functional (see Supplemental Table 1 online). Solubility of 4-CL1 and HCT (Figures 2I and 2J) was attested by their transport into the nucleus and further supported by high mobility observed in FRAP analysis (Figures 4E and 4F). Free diffusion of both enzymes is comparable to that of free eGFP and too fast for detectable photobleaching. However, both 4-CL1 and HCT generate a fuzzy reticulate pattern in the

parietal regions of the cell (Figures 2K and 2L). This reticulate pattern is due to the squeezing of the cytoplasm between the turgescence vacuole and the cell wall but might also be indicative of a partial association of the soluble enzymes with the ER as previously reported for tobacco PAL1 (Bassard et al., 2012). We thus analyzed the distribution of the eGFP-tagged 4-CL1 and HCT proteins near the ER tubules and compared it to the distribution of the free eGFP, eGFP fused to the HDEL ER retention signal, and to NtPAL1:eGFP by image analysis of fluorescence as recently described by Bassard et al. (2012). The statistical analysis of the fluorescent pixels around the ER tubules indicated a similar distribution for eGFP and 4-CL1, whereas HCT was found more closely associated with the ER (Figure 2M).

To confirm membrane association of HCT, soluble fractions and washed microsomal membranes were prepared from leaves of *N. benthamiana* expressing the soluble tag-free protein before testing enzyme activity. Significant activity was found associated with the microsome fraction (Figure 2N). HCT activity was also detected in washed microsomes isolated from control noninfiltrated plants. Membrane association was further confirmed by immunodetection of GFP in the membrane fraction prepared after transient expression of the eGFP fusion protein (Figure 2O).

Taken together, our data indicate partial association of HCT with the ER membranes, which is reminiscent of what was previously reported for PAL1 (Rasmussen and Dixon, 1999; Achnine et al., 2004; Bassard et al., 2012). This association can be detected with isolated membranes and in vivo.

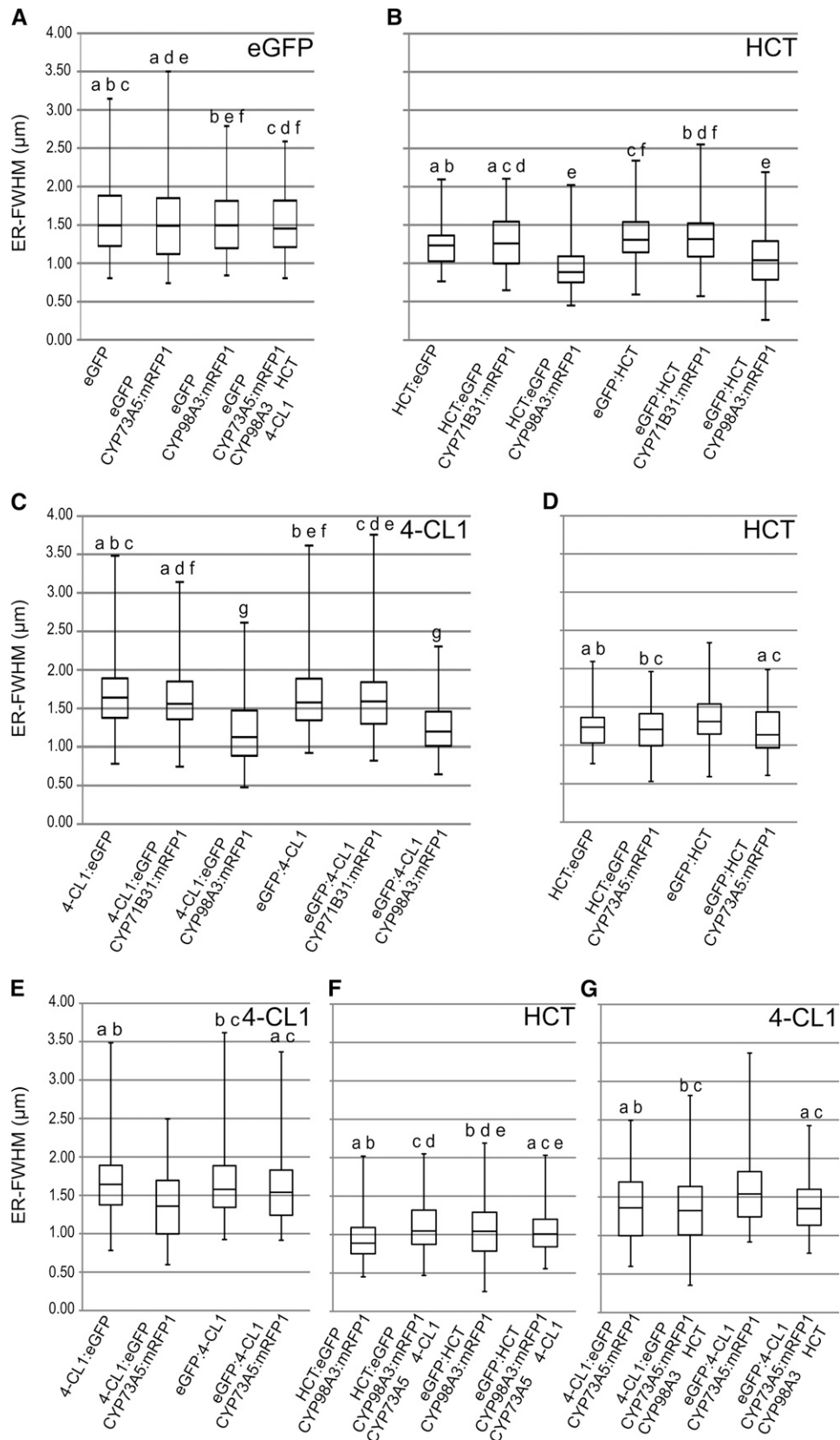


Figure 5. Distribution of HCT and 4-CL1 around ER Tubules Detected by CLSM.

Expression of CYP98A3 Redistributes HCT and 4-CL Closer to the ER

To test if P450 proteins may influence membrane association of their soluble partners, we evaluated the impact of P450 expression on the localization of HCT and 4-CL1. In a first step, each soluble protein was coexpressed with each P450. Soluble proteins were tagged with eGFP and P450s with monomeric Red Fluorescent Protein 1 (mRFP1) for confirmation of their expression in the cells selected for measurement. After optimization in standard experiments, visual assessment indicated that nearly 100% of the epidermal cells expressed the fluorescent proteins.

Coexpression with CYP98A3 triggered a significant relocation of both HCT and 4-CL1 nearer to the ER, independent of the position of the tag (Figures 5A to 5C). CYP98A3 did not influence the distribution of free eGFP, and expression of CYP71B31, a P450 enzyme involved in isoprenoid metabolism (Ginglinger, 2010), did not modify the distribution of both HCT and 4-CL1. Localization of the soluble proteins was little affected by the coexpression of CYP73A5, with redistribution of 4-CL1 closer to the ER detected only when eGFP was fused at its C terminus (Figures 5D and 5E). We next tested the effect of addition of the two additional partner enzymes, the latter expressed without tags to keep the steric interference of the fluorescent tags minimal (Figures 5F and 5G). Significant redistribution in the presence of CYP98A3 and HCT was observed only in the case of eGFP:4-CL1, which was not pulled closer to the ER by CYP73A5:mRFP1 expressed alone (Figure 5G). No further change in protein distribution was detected when 4-CL1 or HCT were already drawn closer to the membrane by the expression of a single P450 protein.

CYP98A3 expression thus seems to drive redistribution of HCT and 4-CL1 near the ER membrane, while CYP73A5 only has a minor effect.

CYP98A3 and CYP73A5 Associate to Form Homo- and Heteromers

Supramolecular organization of the lignin pathway would imply protein–protein interaction or at least local concentration of the partners involved. Indeed, TAP-tagging experiments performed with CYP98A3 led to repeated copurification of CYP73A5 (Table 1). To further corroborate protein interaction or association, the

different target proteins were coexpressed as fusion constructs with different fluorescent proteins suitable for fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM).

First we investigated the P450–P450 self- and cross-interactions. FRET detected upon expression of different P450 combinations was compared with FRET obtained upon P450 expression with free mRFP and mRFP anchored into the cytoplasmic surface of ER via the N-terminal signal peptide of the plant sterol 14 α -demethylase CYP51G1 (51-mRFP) as a negative control (Bassard et al., 2012).

Background FRET values (between 3.6 and 5.5%) were detected between soluble free mRFP and P450:eGFP proteins (Table 2). FRET between anchored 51-mRFP and P450s yielded comparable values (between 0 and 2.7%). By contrast, a high FRET value of 22.2% between eGFP- and mRFP-tagged CYP98A3s indicated a high propensity to dimerize or oligomerize. The FRET value was also significant although lower (9.3%) upon coexpression of CYP73A5:eGFP and CYP73A5:mRFP. Tests for cross-interactions between CYP73 and CYP98 provided FRET values ranging from 9.1 to 17.2% depending on the donor and acceptor protein, which most likely reflects a variable environment caused by the fusion with the fluorescent probes. As an additional negative control, we determined the FRET values resulting from the coexpression of CYP73A5 and CYP98A3 with CYP71B31, a P450 enzyme involved in isoprenoid metabolism (Ginglinger, 2010), which never exceeded 6%.

Taken together, our data support the formation of homo- and heteromers (dimers or higher order oligomers) of CYP98A3 and CYP73A5. Tighter protein interaction is observed with CYP98A3, alone or in combination with CYP73A5.

P450 Association with Soluble Partners Is Enhanced by Coexpression of More Partner Enzymes

The association of CYP98A3 and CYP73A5 with HCT and 4-CL1 was tested in the presence or absence of the other two partner enzymes (Table 3). FLIM analysis was first performed to investigate interaction of CYP73A5 (eGFP at the C terminus) with 4-CL1 and HCT (mRFP at the N or C terminus). Low FRET values (0 to 5.3%) were indicative of no or poor interaction of CYP73A5 with 4-CL1 or HCT (Table 3). However, association of CYP73A5 with HCT was significantly increased upon coexpression of CYP98A3 and 4-CL1, with FRET values reaching 8.6 to 10.3%.

Figure 5. (continued).

Confocal images were recorded 5 d after agroinfiltration of the *N. benthamiana* leaves. Box plots are shown. For each experimental condition, 100 measurements were randomly recorded from independent images. a, b, c, d, e, and f indicate pairs with similar distribution according to ANOVA analysis (see Supplemental Data Set 2 online). ER-FWHM, ER-full width at half maximum expressed in micrometers. See Supplemental Figure 4 online for dot blot confirmation of protein expression and Supplemental Figure 5 online for comparison of the expression of the CYP71B31, CYP98A3, and CYP73A5 constructs.

- (A) Distribution of eGFP (control).
- (B) Distribution of HCT coexpressed with CYP98A3 or CYP71B31 (negative control).
- (C) Distribution of 4-CL1 coexpressed with CYP98A3 or CYP71B31 (negative control).
- (D) Distribution of HCT coexpressed with CYP73A5.
- (E) Distribution of 4-CL1 coexpressed with CYP73A5.
- (F) Distribution of HCT when coexpressed with the three other enzymes.
- (G) Distribution of 4-CL1 when coexpressed with the three other enzymes.

Table 2. Measures of Fluorescence Lifetime of P450:eGFP and FRET Evaluation of P450:eGFP/P450:mRFP1 Associations

Expressed Proteins			Fluorescence Lifetime (ns)		FRET Efficiency	
Donor	Acceptor	<i>n</i>	Average	SD	%	SD
CYP73A5:eGFP	/	121	2.05	0.09	–	–
	mRFP1	30	1.97	0.08	3.6	0.2
	Anchored-mRFP1	20	1.99	0.31	2.7	0.4
	CYP71B31:mRFP1	17	1.96	0.07	4.5	0.3
	CYP98A3:mRFP1	22	1.70	0.17	17.2	1.8
	CYP73A5:mRFP1	26	1.86	0.07	9.3	0.5
CYP98A3:eGFP	/	112	2.12	0.15	–	–
	mRFP1	17	2.00	0.14	5.5	0.5
	Anchored-mRFP1	18	2.13	0.07	0.0	0.0
	CYP71B31:mRFP1	8	2.13	0.23	0.0	0.1
	CYP98A3:mRFP1	20	1.65	0.09	22.2	2.0
	CYP73A5:mRFP1	26	1.92	0.12	9.1	0.9
CYP71B31:eGFP	/	11	2.33	0.16	–	–
	CYP98A3:mRFP1	10	2.22	0.13	4.4	0.4
	CYP73A5:mRFP1	8	2.18	0.12	6.4	0.6

Values of P450:eGFP fluorescence lifetimes were obtained by FLIM. FRET efficiency is calculated by comparison with eGFP fluorescence lifetime measured in a control experiment in absence of the mRFP1 acceptor protein. *n*, number of independent cells analyzed. Slash indicates no acceptor; dash indicates no value; bold value indicates value higher than controls.

A similar FLIM analysis was performed to test CYP98A3 association with HCT or 4-CL1. FRET values of 10.3% indicated proximity of HCT to CYP98A3 in the absence of the other partner enzymes. This association seemed to involve specific regions of the proteins since it occurred only with the N-terminal tagged mRFP:HCT. In the latter configuration, interaction was not further enhanced by the coexpression of CYP73A5 and 4-CL1. Conversely, interaction of CYP98A3 with the C-terminal tagged HCT:mRFP required the coexpression of partner protein (s) that favored close proximity of the eGFP and mRFP labels in the complex as indicated by a high FRET value of 18.2%. No interaction of CYP98A3 with 4-CL1 was detected in the absence of CYP73A5 and HCT. However, coexpression of the latter proteins drove CYP98A3/4-CL1 association, independent of the position of the mRFP-tag on 4-CL1.

Finally, we tested if it was possible to detect 4-CL1 and HCT association (see Supplemental Table 2 online). Background FRET values between 0 and 2.3% were measured between the soluble proteins with all possible combinations of fusions with fluorescent probes. Upon coexpression of the P450 enzymes, an average FRET of 6.2% was detected with the 4-CL1:eGFP and HCT:mRFP combination. While this suggests possible spatial reorganization and closer proximity of the soluble proteins in the presence of partner P450s, it remains too low to conclude. However, values reached close to 20% in a small number of cells where relocalization was clearly visible in confocal images. The factor (cell type and stress) responsible for this conditional interaction could not be identified from the inspection of the leaf tissues.

Local Wounding Enhances Protein Association

The conditional interactions observed in the differential TAP tagging of the P450 membrane proteins upon induced lignification in plant cells (Table 1) raised the question whether protein

interaction or association can be influenced by the physiological status of the plant and/or the metabolic flux in the phenylpropanoid pathway.

Mechanical injury is known to activate the expression of the genes of the phenolic pathway to support lignin and suberin deposition in the wound periderm near the wound site (Hawkins and Boudet, 1996; Moura et al., 2010), and activated expression of CYP73A5 and CYP98A3 around wounded leaf tissues was reported in *Arabidopsis* (Nair et al., 2002). Injury might thus provide a natural context favoring protein association. Hence, we investigated enzyme localization in the cell layers located in a wound healing zone. Transfected leaves of *N. benthamiana* were injured with a nail board 3 h before evaluation of protein relocalization in the healing cell layer (see Supplemental Figure 2A online). No wounding effect was detected with eGFP used as negative control (Figure 6A). Relocalization was observed with eGFP:4-CL1 expressed alone or coexpressed with CYP73A5, CYP98A3, or with a combination of CYP98A3, CYP73A5, and HCT (Figure 6B). Relocalization of HCT was detected only when HCT:eGFP was coexpressed with CYP73A5 (see Supplemental Figure 2B online).

FLIM analysis was then performed to determine if this resulted in enhanced protein association (see Supplemental Figure 2C online). Wounding did not result in significant changes in FRET values upon expression of eGFP-tagged P450s in any combination with other potential partners. By contrast, a clear wound effect was observed on the 4-CL1/HCT combinations with an average FRET value of 12.0% measured in the healing zone compared with 2.1% in healthy tissues. As already mentioned above, relocalization of the soluble proteins was visible in only a fraction of the cells when all four enzymes were present (Figure 6C). This fraction increased to 50% (instead of 20%) of the cells in the wound periphery. FRET values reached 19.5% between fluorescent 4-CL and HCT in these cells (see Supplemental Figure 2C online). The wound-healing context thus seems to

Table 3. Measures of Fluorescence Lifetime of P450:eGFP and FRET Evaluation of Associations between P450:eGFP and Soluble Enzymes:mRFP1

Expressed Proteins				Fluorescence Lifetime (ns)		FRET Efficiency	
Donor	Acceptor	Untagged Proteins	<i>n</i>	Average	SD	%	SD
CYP73A5:eGFP	/	/	121	2.05	0.09	–	–
	mRFP1	/	30	1.97	0.08	3.6	0.2
	mRFP1	CYP98A3/HCT /4-CL1	10	2.20	0.08	0.0	0.4
	mRFP1:4-CL1	/	17	2.10	0.05	0.0	0.1
		CYP98A3/HCT	20	1.93	0.07	5.7	0.3
	4-CL1:mRFP1	/	41	1.94	0.07	5.3	0.3
		CYP98A3/HCT	16	2.02	0.05	1.4	0.1
	HCT:mRFP1	/	17	1.99	0.03	2.9	0.1
		CYP98A3/4-CL1	17	1.88	0.06	8.6	0.5
	mRFP1:HCT	/	17	2.06	0.07	0.0	0.0
CYP98A3:eGFP		CYP98A3/4-CL1	17	1.84	0.07	10.3	0.6
	/	/	112	2.12	0.15	–	–
	mRFP1	/	17	2.00	0.14	5.5	0.5
	mRFP1	CYP73A5/HCT/4-CL1	11	2.33	0.08	0.0	0.8
	HCT:mRFP1	/	25	2.18	0.12	0.0	0.3
		CYP73A5/4-CL1	15	1.73	0.09	18.2	1.6
	mRFP1:HCT	/	26	1.90	0.12	10.3	1.0
		CYP73A5/4-CL1	22	1.89	0.12	10.5	1.0
	4-CL1:mRFP1	/	37	2.06	0.14	2.7	0.3
		CYP73A5/HCT	26	1.92	0.16	9.4	1.0
mRFP1:4-CL1	/	27	2.06	0.19	2.4	0.3	
	CYP73A5/HCT	22	1.86	0.21	12.2	1.6	

Values of P450:eGFP fluorescence lifetimes were obtained by FLIM. FRET efficiency is calculated by comparison with eGFP fluorescence lifetime measured in a control experiment in absence of the mRFP1 acceptor protein. To determine the contribution of the different partners to the interaction between each P450 and soluble protein, the other proteins were expressed without fluorescent tags. *n*, number of independent cells analyzed. Slash indicates no acceptor; dash indicates no value; bold value indicates value higher than controls. See Supplemental Table 2 online for FLIM measured between soluble proteins and Supplemental Figure 4 online for dot blot confirmation of protein expression.

favor association of 4-CL1 and HCT in the presence of CYP73A5 and CYP98A3.

DISCUSSION

This work provides an extensive analysis of the localization and dynamic association of four sequential enzymes around the first branch point in phenylpropanoid metabolism. Our investigation was performed in a natural plant context to provide the best possible membrane lipid and protein environment and to ensure the presence of metabolites at physiological concentrations, since these factors are likely to influence protein-membrane organization. An optimal context would be provided by vascular tissues where all relevant metabolites and partner proteins would be found. Vascular cells are currently not accessible for confocal live imaging. This analysis was thus performed on epidermal tissues. Whereas their protein and metabolite contents do not perfectly match the content of actively lignifying tissues, the overexpression of rate-limiting P450 enzymes of the monoglucosyl pathway likely modify cellular homeostasis in a favorable way for our analysis. Wounding and subsequent cell repair provide a further contextual improvement. To limit the bias potentially resulting from protein overexpression, the analyses were performed at the early stages of protein expression, before

the appearance of vesicular material and detectable modifications of the ER membranes.

P450s Move with the Fast Remodeling Plant ER but Their Lateral Mobility Is Restricted

In contrast with the animal cell system in which CYP2C2 was shown to be freely mobile throughout the ER (Szczena-Skorupa et al., 1998), the plant CYP73A5 and CYP98A3 appeared to be fast streaming together with the highly dynamic plant ER, while their lateral diffusion on the surface of the membrane was restricted. The mobility of the plant P450 enzymes thus seems to essentially rely on the actin/myosin cytoskeleton and on the high ER plasticity, which was recently described to be a remarkable characteristic of plant cells (Sparkes et al., 2009). Fast streaming of the plant ER provides an opportunity for accelerated exchanges between membrane-anchored enzymes and the cytosolic proteins and metabolites. It may thus be an important factor to enhance plant metabolism.

An explanation for the restricted lateral mobility on the membrane surface could be direct or indirect anchoring to a cytoskeleton-associated element or their association with larger membrane structures. Both CYP73A5 and CYP98A3 interacted in TAP-tagging experiments with several ER-resident proteins, such

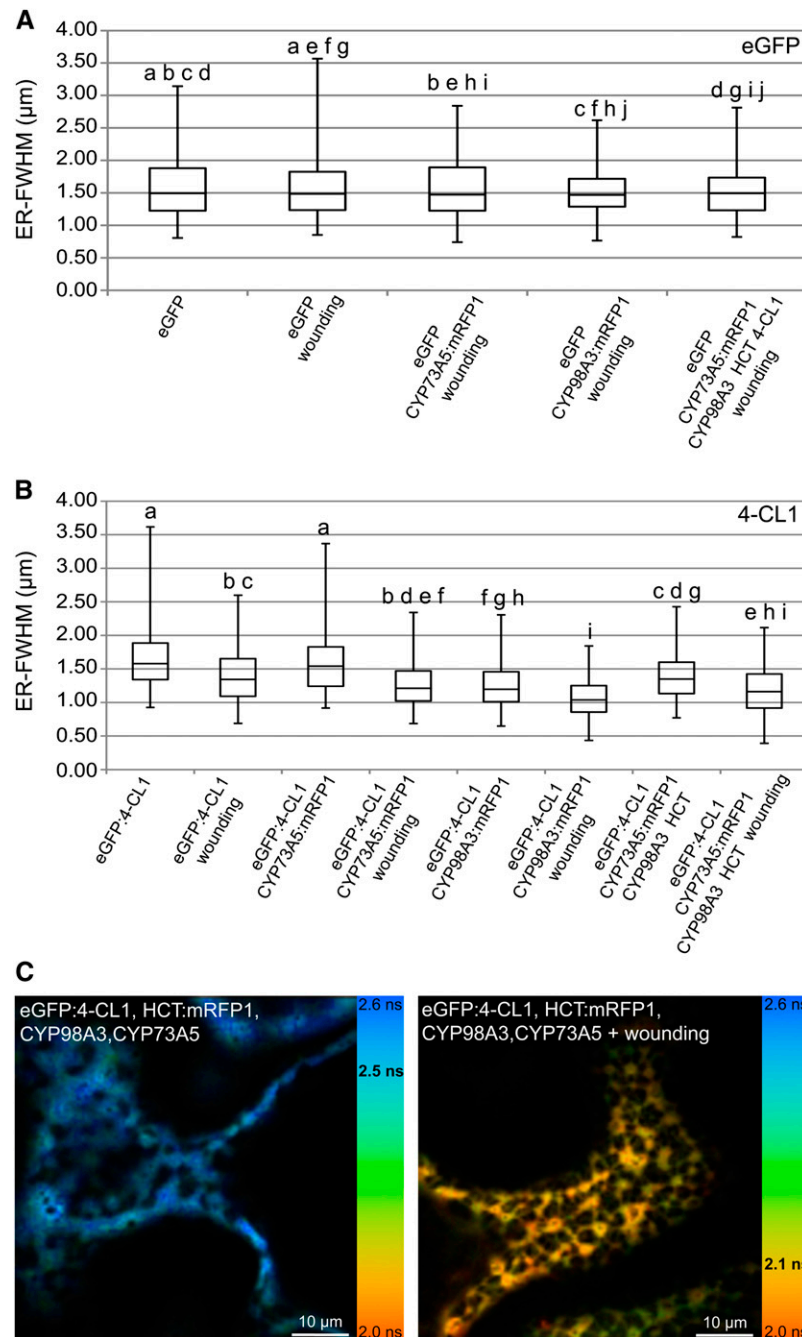


Figure 6. Effect of Wounding on Fluorescence Lifetime Values and Relocalization of Soluble Proteins.

(A) Box plot comparing distribution of eGFP (control) in the wound-healing zone upon coexpression of proteins of interest.

(B) Box plot comparing distribution of 4-CL1 in the wound-healing zone upon coexpression of partner proteins.

For each experimental condition, 100 measurements were randomly recorded from independent images. a, b, c, d, e, f, g, h, i, and j indicate pairs significantly similar according to ANOVA analysis. See Supplemental Data Set 2 online for details about ANOVA results. ER-FWHM, ER-full width at half maximum expressed in micrometers. The transfected leaves were wounded with a nail board 3 h before acquisition of the images in the healing zone.

(C) Effect of wounding on protein–protein interactions. Images were recorded 5 d after agroinfiltration of the *N. benthamiana* leaves. Fluorescence lifetime images acquired by FLIM are pseudo-colored according to the color code ranging from 2.0 ns (orange) to 2.6 ns (light blue). The mean lifetime value measured in the image is indicated in bold black on the color scale. Bars = 10 µm.

See Supplemental Figure 2 online for details about relocalization analysis procedure, HCT relocalization, and FLIM after wounding.

as reticulons that contribute to ER shaping and to the formation of high molecular weight protein complexes (Table 1). In a similar way, the mammalian CYP2C2 was shown to interact with the ubiquitous BAP31 integral membrane protein (Szczesna-Skorupa and Kemper, 2006) reported to associate with the cytoskeletal components actin and myosin (Ducret et al., 2003). BAP31 was shown to be important to maintain expression levels of CYP2C2 and to support its ER retention (Szczesna-Skorupa and Kemper, 2006). In animal cells, however, this CYP2C2–BAP31 association did not seem to restrict the P450 mobility. More recently, tagged P450 protein complexes were isolated from mouse liver that, in addition to soluble drug-metabolizing enzymes, contained chaperones and reticulons (Li et al., 2011). The latter are integral ER proteins reported to shape cortical ER tubules and proposed to contribute to protein retention and anchoring into the ER and cytoskeleton (Sparkes et al., 2009; Nziengui and Schoefs, 2009; Tolley et al., 2010).

Another factor potentially restricting CYP73A5 and CYP98A3 mobility could be their involvement in large homo/heteropolymers and/or in more complex supramolecular structures. Such multimeric complexes could have reduced mobility simply because of their size but could, in addition, be associated with membrane microdomains, or membrane protein(s). Strikingly, a large number of the CYP73A5/CYP98A3 interactors identified by TAP (Table 1) are related in some way to lipids or sterols. This suggests that lipid microenvironment could be an important factor of protein association and activity. A small transmembrane protein Erg28p was reported to interact with several enzymes involved in sterol biosynthesis, including CYP51 (or Erg11p), catalyzing sterol 14 α -demethylation, and the homolog of plant SMT2 sterol C-24 methyltransferase, in yeast. The Erg28p protein with no reported catalytic activity was proposed to tether a large complex of yeast sterol biosynthetic enzymes (Mo and Bard, 2005). No plant homolog to Erg28p has been reported so far, but several of the proteins identified by TAP might play a role similar to Erg28p and attempts to reveal protein complexes using blue native gel blots of microsomes isolated from plant leaves transfected with CYP98A3 revealed the presence of the CYP98A3 protein in several protein aggregates with molecular masses ranging up to 700 kD (see Supplemental Figure 3 online), which seems to confirm tight association with other membrane proteins.

Why Do P450s Form Oligomers?

In support of the existence of multimeric protein organization, our FLIM analyses clearly indicate that CYP98A3 self-associates to form homodimers or oligomers. Lower FRET values observed for CYP73A5 seem to indicate looser self-association. Both TAP tagging and FRET concur to show that CYP73A5 and CYP98A3 also interact to form heteromers. Conversely, selectivity of TAP tagging and poor interaction with a control fluorescent probe anchored on the cytoplasmic surface of the ER via the N-terminal transmembrane helix of the sterol 14 α -demethylase CYP51G1 or with the ER-localized monoterpene-metabolizing CYP71B31 indicate that this interaction is specific and does not just result from a crowding effect.

P450 aggregation has been mainly documented for mammalian enzymes, and the formation of homo- and hetero-oligomers was detected in solution, in reconstituted systems in vitro (Myasoedova and Berndt, 1990; Cawley et al., 2001; Davydov et al., 2005; Hazai and Kupfer, 2005; Subramanian et al., 2010; Reed and Backes, 2012), but also in natural membranes or living cells (Backes and Kelley, 2003; Szczesna-Skorupa et al., 2003; Ozalp et al., 2005; Praporski et al., 2009; Hu et al., 2010). Furthermore, P450 proteins, such as human CYP2B4 and CYP2C8, crystallized as homodimers (Scott et al., 2003; Schoch et al., 2004). The size of the reported oligomers ranges from dimers up to 40-mers (Backes and Kelley, 2003). Oligomers have been reported to be more active than monomers. Homo- and heterotypic interaction seems P450 specific, selectively modulates P450 activities, and was shown in many instances to be mediated by the membrane-anchored hydrophobic N terminus (Szczesna-Skorupa et al., 2003; Ozalp et al., 2005; Subramanian et al., 2010). It is interesting to note that our TAP-tagging experiments not only detected CYP98A3–CYP73A5 interaction, but also that the orphan CYP706A1/2 bound both CYP73A5 and CYP98A3 under induced and noninduced conditions, while CYP71B15, in the indole pathway, bound to them only under induced conditions. This observation might give a hint to the function(s) of CYP706A1/2 (phylogenetically most closely related to the flavonoid-metabolizing CYP75) and might point to some form of crosstalk between lignin and indole-derived metabolism.

The impact of multimerization on CYP73/CYP98 enzyme activity could not be properly evaluated in the context of plant tissues with background activity but, during the preparation of this article, Chen et al. (2011) reported heteromerization of the poplar homologs of CYP73A5 and CYP98A3 that led to a drastic enhancement of their catalytic functions in yeast microsomes. However, in that report, the activities of the poplar enzymes measured in the absence of each partner P450 were very low, and those observed upon coexpression of both enzymes were closer to those described for *Arabidopsis* CYP73A5 and CYP98A3 individually expressed in yeast (Schalk et al., 1997; Schoch et al., 2001). Heteromerization thus seems to be less critical for activation of *Arabidopsis* CYP73A5 and CYP98A3.

In addition to the potential allosteric effect, P450 association in oligomers would increase the local concentration of P450 enzymes and of their products. This might be required to match metabolic demand and to feed soluble enzymes since P450s usually catalyze the slow steps in the pathway. The work of Davydov et al. (2000), based on high-pressure spectroscopy, suggested that P450 aggregation might contribute to their stability. Interestingly, in the case of human CYP2C8, it has been shown that the formation of homodimers relies on both signal anchor and F-G loop interfaces (Hu et al., 2010). In such a model, the monomers must be tilted so that the F-G loop is no longer in the membrane and the surface of contact with the ER is decreased. In the case of CYP73s and especially of CYP98s with very hydrophilic substrates, dimerization may thus favor substrate access to the active site. P450 activity in addition requires electrons provided by CPR also anchored via its N terminus in the ER. P450s are usually present in 10- to 20-fold excess over CPR (Backes and Kelley, 2003). It has therefore

been proposed that P450s could be organized as clusters around CPRs (Peterson et al., 1976). With such organization, clustering would favor P450 reduction when CPR is in sub-saturating amounts. In favor of such a model, P450 was reported to be more active in an aggregated state, and increasing CPR concentration was reported to disrupt P450 aggregation and to increase its mobility (Backes and Kelley, 2003). While a free diffusion model was recently considered as more likely, P450–CPR association would be required in the case of restricted lateral mobility.

Cytochrome b_5 is an alternative electron donor for P450 enzymes. It was shown to favor P450-catalyzed reactions by allowing faster transfer of the second electron in the catalytic cycle compared with NADPH-P450 reductase and to induce conformational changes in P450 catalytic sites (Schenkman and Jansson, 2003). Quite interestingly, TAP tagging, mainly in the case of CYP73A5, indicates interaction with a NADH-cytochrome b_5 reductase. While cytochrome b_5 is usually considered as non-essential for P450 activity *in vitro*, a genetic approach pointed to its importance for P450 function in phenolic metabolism, to achieve effective flavonoid 3'-5'-hydroxylation and to a lesser extent cinnamic acid hydroxylation in petunia (*Petunia hybrida*; de Vetten et al., 1999). Another recent report also points the importance of NADH-cytochrome b_5 reductase for effective fatty acid hydroxylation in *Arabidopsis* (Kumar et al., 2006). A potential structuring role of NADH-cytochrome b_5 reductase may thus deserve closer investigation.

The Expression of CYP98A3 Favors Partner Localization near the ER and Protein Association

Formation of P450 oligomers could also favor flux transfer of metabolites and provide a platform to bridge soluble enzymes. At this stage, it seems unlikely that P450s form stable complexes with their soluble partner enzymes since neither TAP tagging nor blue native gel experiments detected P450 interaction with HCT or 4-CL. However, we observed consistent increases in their relocalization upon P450 expression and increased FRET among partners upon coexpression of selected proteins, reminiscent of the tobacco PAL2 relocalization observed upon C4H expression by Achnine et al. (2004). The highest FRET values between P450s and soluble enzymes were obtained upon coexpression of the four proteins both in intact and wounded tissues. It was not due to a crowding effect since it was not observed with free eGFP and for all tested combinations. The most consistently high FRET values were observed for the couple CYP98A3–HCT. This is in agreement with the following facts: (1) HCT is found associated with the membrane and readily relocalizes to the ER upon coexpression of CYP98A3, (2) HCT is both the donor of substrate and acceptor of product of CYP98A3 (Hoffmann et al., 2003), and (3) the shikimate conjugates of *p*-coumaric and caffeic acid that are the metabolic intermediates between the two enzymes are usually not detected in tissues of wild-type *Arabidopsis* (Schoch et al., 2006). The latter observation implies a tight coupling between CYP98A3 and HCT that might require close enzyme association. Less expected was the influence of CYP98A3 on 4-CL1 re-distribution closer to the ER (Figure 5C) and the association of

CYP98A3 with 4-CL1 detected upon coexpression of other partner enzymes (Table 3). The reciprocal effect of CYP98A3/4-CL1 expression on the association of CYP73A5 and HCT would suggest that the formation of P450 heteromers could be driving such associations. It is interesting to note that the CYP98A3–HCT association is influenced by the fluorescent tag localization at the N or C terminus of HCT (Table 3) and that CYP73A5/4-CL1 association with the tagged enzymes could not be detected, which supports some supramolecular organization rather than just protein concentration at the surface of the ER.

The presence of partner enzymes investigated in this study does not seem to be the only factor affecting protein localization and association. We observed a strong enhancement of protein association located in the healing zone after mechanical injury. General activation of the lignin pathway and resulting expression of other partner proteins and/or modification of the metabolome in the healing cells could be driving forces of such protein association. This suggests that beyond direct protein interactions, the cellular and membrane contexts should also be investigated.

Conclusion

CYP73A5 and CYP98A3 associate to form homomers and heteromers but also strongly and specifically interact with other membrane proteins potentially associated with membrane structure, mobility, and lipid composition. Looser association of both P450s with HCT and 4-CL1 is also observed, with CYP98A3 playing a prominent nucleation role in this association. In particular, the CYP98A3/HCT couple seems to readily associate *in vivo*, but this association is not stable enough to be detected by TAP tagging or blue native gel blot experiments that require use of mild detergents. Interactions among membrane proteins are thus stronger than those observed between P450s and their soluble partner enzymes. Our data suggest that clusters of membrane proteins might provide a platform for further more loose association of soluble partners, which may well be considered a dynamic metabolon. A more extensive characterization of associated membrane proteins will provide a helpful background to reveal supramolecular structures or local environments that harbor metabolic enzymes and likely favor protein associations.

METHODS

Construction of Candidate Protein Fusions with Fluorescent Proteins

Construction of the pCAMBIA2300 (for eGFP fusion) and pCAMBIA3300 (for mRFP fusion) plasmids with tagged CYP73A5 and CYP98A3 and anchored-eGFP and mRFP1 constructs was described by Bassard et al. (2012). Construction of the pCAMBIA2300 and pCAMBIA3300 plasmid with the CYP71B31:eGFP/mRFP1 fusion was described by Ginglinger (2010). The full-length coding sequences of *HCT* and *4-CL1* were amplified with appropriate primers (see Supplemental Table 3 online) and fused in 5' or 3' with the amplified mRFP1 or eGFP coding sequences in the pCAMBIA230035Su or pCAMBIA330035Su vectors with the PCR-based USER fusion cloning technique (Geu-Flores et al., 2007). The plasmids for expression of untagged CYP73A5, CYP98A3, HCT, and 4-CL1 were constructed by amplification of the coding sequences of

the respective genes and insertion of the amplicons in the vector pCAMBIA230035Su or pCAMBIA330035Su with the single insert USER cloning technique (Nour-Eldin et al., 2006).

A comprehensive list of the primers used for the constructions is provided in Supplemental Table 3 online. All PCR-based constructs were sequence verified for proper in-frame insertion and absence of mutations.

Transient Expression in *Nicotiana benthamiana* Leaf Epidermal Cells

The cauliflower mosaic virus 35S promoter-driven genes were introduced into *N. benthamiana* leaves by agroinfiltration for transient expression as described by Bassard et al. (2012). At 4 to 5 d after infiltration, leaf disks were excised for observation by confocal microscopy, or leaves were collected to prepare soluble extracts and microsomal membranes.

Agrobacterium tumefaciens strains harboring vectors for the expression of eGFP:HDEL and mRFP1:HDEL were kindly provided by C. Ritzenthaler (Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Strasbourg, France). Expression of untagged proteins was confirmed by dot blot (see Supplemental Figure 4 online).

Preparation of Microsomal Membranes

Fresh tissues were ground in extraction buffer (40 mM ascorbic acid, 15 mM β -mercapthoethanol, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, and 10% glycerol in 0.1 M sodium phosphate, pH 7.4) in a ratio of 10 mL of buffer to 1 g of fresh tissue. Grinding was performed with an Ultra-turrax T25 (IKA) by two successive runs of 1 min at 7000 rpm. The extract was filtered on Miracloth (Calbiochem) and centrifuged for 10 min at 10,000g. The resulting supernatant was filtered on Miracloth and ultracentrifuged for 1 h at 100,000g at 4°C. For 4-CL1 and HCT activity tests and control dot blot with eGFP, the supernatant was kept and the resulting pellet of microsomes was resuspended in extraction buffer in a ratio of 10 mL of buffer to 1 g of fresh tissue. The mixture was ultracentrifuged for 1 h at 100,000g at 4°C. The pellet was washed with 3 \times 2 mL of recovery buffer (30% glycerol in 0.1 M sodium phosphate, pH 7.4) and carefully resuspended in recovery buffer (10 μ L per gram of initial fresh tissues). Microsomes and supernatant were stored at -30°C until analysis. Total protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay.

Test of 4-CL1 and HCT Activities

The 4-CL1 assay was performed in a microplate reader (Synergy HT; Biotek), monitoring the absorbance of the product at 333 nm. The assay mixture contained 4 μ L of fraction to analyze, 1 mM DTT, 2.5 mM ATP, 2.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM *p*-coumaric acid, and 50 mM potassium phosphate, pH 7.4. Reaction was started by the addition of 0.4 mM reduced CoA (Sigma-Aldrich). Kinetics were recorded at 25°C. Specific activities (SA) were calculated from initial velocity of product formation using the extinction coefficient for *p*-coumaroyl CoA: $\epsilon_{333 \text{ nm}} = 21 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Stöckigt and Zenk, 1975).

The HCT assay was performed in UV-star microplates (Greiner Bio-One), monitoring the absorbance of the product at 310 nm with a microplate reader (Synergy HT). The assay mixture contained the fraction to analyze (20 to 80 μ g of total proteins), 1 mM DTT, 0.68 mM shikimic acid (Sigma-Aldrich), and 50 mM potassium phosphate, pH 7.4. Reactions were started by addition of 0.14 mM coumaroyl CoA (see Supplemental Methods 1 online for details about the preparation). Kinetics were recorded at 30°C. Specific activities were calculated from initial velocity of product formation using the extinction coefficient for *p*-coumaroyl shikimate: $\epsilon_{310 \text{ nm}} = 21.7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Confocal Laser Scanning Microscopy

Cell imaging was performed using a Zeiss LSM510 laser scanning confocal microscope equipped with an inverted Zeiss Axiovert 200 microscope (Carl Zeiss). Images were recorded using a C-apochromat ($\times 63/1.2$ W Korr; Carl Zeiss) water immersion objective lens. For wide-field observations, a $\times 20$ Zeiss objective was used. Excitation/emission wavelengths were 488/505 to 550 nm for eGFP and 561/575 to 615 nm for mRFP1. The images were acquired using AIM version 2.8 software (Carl Zeiss) and directly analyzed with ImageJ version 1.43n3 (Wayne Rasband, National Institutes of Health). The movies were acquired using a Zeiss LSM700 laser scanning confocal microscope with a Plan-Apochromat ($\times 63/1.4$ oil differential interference contrast M27) oil immersion objective lens. Excitation/emission wavelengths were 488/SP555 nm for eGFP. The movies were acquired and prepared using the Zen version 2009 software (Carl Zeiss). Figures were assembled with Illustrator CS4 (Adobe Systems).

Image Acquisition and Processing

Image acquisition and processing was performed as described by Bassard et al. (2012). An analysis of variance (ANOVA) with posthoc analysis was performed with the Bonferroni-Holm posthoc test to determine consistency of significant difference of the values recorded in different conditions. Calculations were performed with the XL toolbox add-in for excel (XL toolbox v3.10; <http://xltoolbox.sourceforge.net/>). Figures were prepared with Excel 2010 (Microsoft) and assembled with Illustrator CS4.

FRAP

The tissues were mounted and cell imaging was performed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) as above. FRAP was performed on ER regions of 90 pixels (x) over 10 pixels (y) using a high-intensity bleach mode (with argon laser at 488 nm), unidirectional scans, intensity at 40 mA, line average 2, and a scan time of 3.15 s. Five prebleaching images were recorded, and area to bleach was photobleached during 200 scans (400 during tests with soluble enzymes). After the bleach, a series of postbleaching scans were performed. The postbleach fluorescence was sampled every 3.15 s. Figures were prepared with Excel 2010 and assembled with Illustrator CS4.

FLIM

The tissues were mounted as described above. FLIM was performed by time-correlated single-photon counting as described by Brandner et al. (2008). Measurements were done on a homebuilt two-photon system based on an Olympus IX70 microscope with an Olympus $\times 60$ 1.2-numerical aperture water immersion objective (Azoulay et al., 2003). Two-photon excitation was provided by a titanium:sapphire laser (Tsunami; Newport) that was setup to an emission wavelength of 900 nm (for eGFP excitation). Imaging was performed with a laser scanning system using two fast galvo mirrors (Model 6210; Cambridge Technology). Photons were collected using a two-photon short-pass filter with a cutoff wavelength of 680 nm (F75-680; AHF), and a band-pass filter 520 ± 17 nm (F37-520; AHF). Fluorescence was analyzed by a fiber-coupled avalanche photodiode detector (SPCM-AQR-14-FC; Perkin-Elmer), which was connected to a time-correlated single-photon-counting module (SPC830; Becker and Hickl) operated in reversed start-stop mode.

The samples were scanned continuously for 1 to 5 min to obtain appropriate photon numbers for reliable statistics for the fluorescence decays. Data were analyzed using SPCimage V2.9 (Becker and Hickl), which uses an iterative reconvolution method to recover the lifetimes from the fluorescence decays. Measurements were done on the whole image

with a threshold setup to 50 and with an average of two pixels. For each condition, average values of all images recorded were used to calculate FRET efficiency. FRET was calculated using the equation: $\text{FRET} = 1 - (\tau_{\text{ASSAY}}/\tau_{\text{ALONE}}) = (R_0^6/(R_0^6 + R))$ with R_0 the Förster radius, R the distance between donor and acceptor, τ_{ASSAY} the lifetime of the donor in the presence of the acceptor, and τ_{ALONE} the lifetime of the donor in the absence of acceptor. Standard deviation was calculated as follows: $\text{SD}_{\text{FRET}} = \% \text{FRET} \sqrt{((\text{SD}_{\text{ASSAY}}/\text{average}_{\text{ASSAY}})^2 + (\text{SD}_{\text{ALONE}}/\text{average}_{\text{ALONE}})^2)}$.

TAP

Cloning of transgenes encoding tag fusions under control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter and transformation of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures were performed as previously described (Van Leene et al., 2007). To scale up production, cells were subcultured in 50 mL of fresh medium without antibiotics at a 1:10 dilution and grown under standard conditions. After 1 week, cells were either harvested (non-induced condition) or washed three times with 200 mL of adapted MSMO medium (4.43 g/L MSMO [Sigma-Aldrich], 30 g/L Suc, and 520 mg/L KH_2PO_4 , pH 5.7) without hormones (induced condition). Washed cells were subsequently transferred to a one-liter shaker flask, diluted in 400 mL of the same medium used for washing, and incubated for 40 h at standard conditions. TAP of protein complexes was performed using the GS tag (Bürckstümmer et al., 2006) with the following protocol modifications. For all protein extractions prior to the affinity purification steps, the detergent Nonidet P-40 was replaced by digitonin (high purity; Calbiochem, Merck). Crude protein extracts were prepared in extraction buffer without detergent. After the mixing step, digitonin was added to a final concentration of 1% (w/v) and extracts were incubated for 1 h at 4°C under gentle rotation. A soluble protein fraction was obtained by centrifugation at 36,900g for two times 20 min at 4°C. In all further steps, the detergent 0.1% (v/v) Nonidet P-40 was replaced by 0.2% (w/v) digitonin. Protein precipitation and separation were done according to Van Leene et al. (2008). For the protocols of proteolysis and peptide isolation, acquisition of mass spectra by a 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems), and mass spectrometry-based protein homology identification based on The Arabidopsis Information Resource genomic database, we refer to Van Leene et al. (2010). Experimental background proteins were subtracted based on ~40 TAP experiments on wild-type cultures and cultures expressing TAP-tagged mock proteins β -glucuronidase, RFP, and GFP (Van Leene et al., 2010).

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under the following accession numbers: CYP98A3 (At2g40890), CYP73A5 (At2g30490), HCT (At5g48930), 4-CL1 (At1g51680), CYP71B31 (At3g53300), eGFP (GenBank DQ768212), mRFP1 (GenBank AF506027), and CYP51G1 (At1g11680).

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure 1. Fluorescence Recovery after Photobleaching.

Supplemental Figure 2. Effect of Wounding on Protein Relocalization and Protein Interaction.

Supplemental Figure 3. 2D Blue Native/SDS-PAGE.

Supplemental Figure 4. Dot Blot of Crude Extracts or Microsomes from *N. benthamiana* Plants Expressing Untagged Proteins.

Supplemental Figure 5. Control of the Coexpression of CYP71B31 with CYP73A5 and CYP98A3.

Supplemental Table 1. eGFP Fusion Constructs Encode Functional Enzymes.

Supplemental Table 2. Interactions among Soluble Proteins.

Supplemental Table 3. List of Primers.

Supplemental Methods 1. Details of Methods Used in This Work.

Supplemental Movie 1. CYP98A3:eGFP Fluorescence in *N. benthamiana* Leaves 5 d after Agroinfiltration.

Supplemental Movie 2. eGFP Fluorescence in *N. benthamiana* Leaves 5 d after Agroinfiltration.

Supplemental Movie 3. eGFP:HDEL Fluorescence in *N. benthamiana* Leaves 5 d after Agroinfiltration.

Supplemental Data Set 1. MS Identification of CYP73A5 and CYP98A3 Interactors Determined by TAP-Tag.

Supplemental Data Set 2. ANOVA Tests of Confocal Analyses.

ACKNOWLEDGMENTS

J.-E.B. and J.G. thank the Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de la Technologie and the Agency for Innovation by Science and Technology in Flanders, respectively, for doctoral fellowships. This project was initiated thanks to the Human Frontier of Science Program RGP0065/2005-C. M.S. and D.W.-R. are grateful for the funding of the Agence Nationale de la Recherche for the PHENOWALL project. We also acknowledge the European Community's Framework VII Program FP7/2007-2013 for funding from the SMARTCELL and RENEWALL projects (Grants 222716 and KBBE-2007-3-1-01, respectively). We thank Leon Otten for critical reading of the article and Christophe Ritzenthaler for helpful discussions.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.-E.B. prepared constructs, designed and performed confocal microscopy, enzyme analysis, and purification, and wrote the first draft. H.R. and F.D. contributed to fusion constructs and to the control experiments. P.U. synthesized coumaroyl-CoA and contributed to supervision. M.S. synthesized coumaroyl quinate. L.R. and J.M. supervised confocal microscopy. E.M. ran the blue native two-dimensional analyses. Y.M. implemented FLIM setup. G.D.J. and A.G. designed TAP analysis. J.G. performed TAP. J.G., W.B., G.D.J., and A.G. analyzed TAP data. A.G. and Y.M. contributed to article redaction. D.W.-R. supervised work and article redaction.

Received August 18, 2012; revised October 20, 2012; accepted October 30, 2012; published November 21, 2012.

REFERENCES

- Achnine, L., Blancaflor, E.B., Rasmussen, S., and Dixon, R.A. (2004). Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **16**: 3098–3109.
- Azoulay, J., Ciamme, J.P., Darlix, J.L., Roques, B.P., and Mély, Y. (2003). Destabilization of the HIV-1 complementary sequence of TAR by the nucleocapsid protein through activation of conformational fluctuations. *J. Mol. Biol.* **326**: 691–700.

- Backes, W.L., and Kelley, R.W.** (2003). Organization of multiple cytochrome P450s with NADPH-cytochrome P450 reductase in membranes. *Pharmacol. Ther.* **98**: 221–233.
- Bassard, J.-E., Mutterer, J., Duval, F., and Werck-Reichhart, D.** (2012). A novel method for monitoring the localization of cytochromes P450 and other endoplasmic reticulum membrane associated proteins: A tool for investigating the formation of metabolons. *FEBS J.* **279**: 1576–1583.
- Bayburt, T.H., and Sligar, S.G.** (2002). Single-molecule height measurements on microsomal cytochrome P450 in nanometer-scale phospholipid bilayer disks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 6725–6730.
- Böttcher, C., Westphal, L., Schmotz, C., Prade, E., Scheel, D., and Glawischnig, E.** (2009). The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **21**: 1830–1845.
- Brandner, K., Sambade, A., Boutant, E., Didier, P., Mély, Y., Ritzenthaler, C., and Heinlein, M.** (2008). Tobacco mosaic virus movement protein interacts with green fluorescent protein-tagged microtubule end-binding protein 1. *Plant Physiol.* **147**: 611–623.
- Browman, D.T., Resek, M.E., Zajchowski, L.D., and Robbins, S.M.** (2006). Erlin-1 and erlin-2 are novel members of the prohibitin family of proteins that define lipid-raft-like domains of the ER. *J. Cell Sci.* **119**: 3149–3160.
- Bürkstümmer, T., Bennett, K.L., Preradovic, A., Schütze, G., Hantschel, O., Superti-Furga, G., and Bauch, A.** (2006). An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells. *Nat. Methods* **3**: 1013–1019.
- Carland, F.M., Fujioka, S., Takatsuto, S., Yoshida, S., and Nelson, T.** (2002). The identification of CYP1 reveals a role for sterols in vascular patterning. *Plant Cell* **14**: 2045–2058.
- Cawley, G.F., Zhang, S., Kelley, R.W., and Backes, W.L.** (2001). Evidence supporting the interaction of CYP2B4 and CYP1A2 in microsomal preparations. *Drug Metab. Dispos.* **29**: 1529–1534.
- Chen, H.C., Li, Q., Shuford, C.M., Liu, J., Muddiman, D.C., Sederoff, R.R., and Chiang, V.L.** (2011). Membrane protein complexes catalyze both 4- and 3-hydroxylation of cinnamic acid derivatives in monolignol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 21253–21258.
- Choi, Y.H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I.W., Witkamp, G.J., and Verpoorte, R.** (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol.* **156**: 1701–1705.
- Costa, M.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.
- Coué, M., Brenner, S.L., Spector, I., and Korn, E.D.** (1987). Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett.* **213**: 316–318.
- Czichi, U., and Kindl, H.** (1975). Formation of p-coumaric acid and o-coumaric acid from L-phenylalanine by microsomal membrane fractions from potato: Evidence of membrane-bound enzyme complexes. *Planta* **125**: 115–125.
- Czichi, U., and Kindl, H.** (1977). Phenylalanine ammonia-lyase and cinnamic acid hydroxylase as assembled consecutive enzymes on microsomal membranes of cucumber cotyledons: Cooperation and subcellular distribution. *Planta* **134**: 133–143.
- Davletov, B.A., and Südhof, T.C.** (1993). A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca²⁺/phospholipid binding. *J. Biol. Chem.* **268**: 26386–26390.
- Davydov, D.R., Fernando, H., Baas, B.J., Sligar, S.G., and Halpert, J.R.** (2005). Kinetics of dithionite-dependent reduction of cytochrome P450 3A4: Heterogeneity of the enzyme caused by its oligomerization. *Biochemistry* **44**: 13902–13913.
- Davydov, D.R., Petushkova, N.A., Archakov, A.I., and Hoa, G.H.** (2000). Stabilization of P450 2B4 by its association with P450 1A2 revealed by high-pressure spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**: 1005–1012.
- de Vetten, N., ter Horst, J., van Schaik, H.P., de Boer, A., Mol, J., and Koes, R.** (1999). A cytochrome b5 is required for full activity of flavonoid 3',5'-hydroxylase, a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 778–783.
- Ducret, A., Nguyen, M., Breckenridge, D.G., and Shore, G.C.** (2003). The resident endoplasmic reticulum protein, BAP31, associates with gamma-actin and myosin B heavy chain. *Eur. J. Biochem.* **270**: 342–349.
- Ehltling, J., Büttner, D., Wang, Q., Douglas, C.J., Somssich, I.E., and Kombrink, E.** (1999). Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant J.* **19**: 9–20.
- Ehltling, J., Shin, J.J., and Douglas, C.J.** (2001). Identification of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) substrate recognition domains. *Plant J.* **27**: 455–465.
- Geu-Flores, F., Nour-Eldin, H.H., Nielsen, M.T., and Halkier, B.A.** (2007). USER fusion: A rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products. *Nucleic Acids Res.* **35**: e55.
- Ginglinger, J.F.** (2010). Functional Analysis of Cytochromes P450 Involved in the Biosynthesis of Monoterpenoids in *Arabidopsis thaliana*. PhD dissertation (Strasbourg, France: University of Strasbourg).
- Griffing, L.R.** (2010). Networking in the endoplasmic reticulum. *Biochem. Soc. Trans.* **38**: 747–753.
- Hamberger, B., and Hahlbrock, K.** (2004). The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 2209–2214.
- Hazai, E., and Kupfer, D.** (2005). Interactions between CYP2C9 and CYP2C19 in reconstituted binary systems influence their catalytic activity: Possible rationale for the inability of CYP2C19 to catalyze methoxychlor demethylation in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **33**: 157–164.
- Hawkins, S., and Boudet, A.** (1996). Wound-induced lignin and suberin deposition in a woody angiosperm (*Eucalyptus gunnii* Hook.): Histochemistry of early changes in young plants. *Protoplasma* **191**: 96–104.
- Hoegg, M.B., Browman, D.T., Resek, M.E., and Robbins, S.M.** (2009). Distinct regions within the erlins are required for oligomerization and association with high molecular weight complexes. *J. Biol. Chem.* **284**: 7766–7776.
- Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet, B., and Legrand, M.** (2004). Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* **16**: 1446–1465.
- Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P., and Legrand, M.** (2003). Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J. Biol. Chem.* **278**: 95–103.
- Hrazdina, G., and Wagner, G.J.** (1985). Metabolic pathways as enzyme complexes: Evidence for the synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes. *Arch. Biochem. Biophys.* **237**: 88–100.
- Hu, G., Johnson, E.F., and Kemper, B.** (2010). CYP2C8 exists as a dimer in natural membranes. *Drug Metab. Dispos.* **38**: 1976–1983.

- Jensen, K., Osmani, S.A., Hamann, T., Naur, P., and Møller, B.L. (2011). Homology modeling of the three membrane proteins of the dhurrin metabolon: Catalytic sites, membrane surface association and protein-protein interactions. *Phytochemistry* **72**: 2113–2123.
- Jørgensen, K., Rasmussen, A.V., Morant, M., Nielsen, A.H., Bjarnholt, N., Zagrobelyny, M., Bak, S., and Møller, B.L. (2005). Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 280–291.
- Kumar, R., Wallis, J.G., Skidmore, C., and Browse, J. (2006). A mutation in *Arabidopsis* cytochrome b5 reductase identified by high-throughput screening differentially affects hydroxylation and desaturation. *Plant J.* **48**: 920–932.
- Li, B., Yau, P., and Kemper, B. (2011). Identification of cytochrome P450 2C2 protein complexes in mouse liver. *Proteomics* **11**: 3359–3368.
- Mo, C., and Bard, M. (2005). Erg28p is a key protein in the yeast sterol biosynthetic enzyme complex. *J. Lipid Res.* **46**: 1991–1998.
- Mo, C., Valachovic, M., and Bard, M. (2004). The ERG28-encoded protein, Erg28p, interacts with both the sterol C-4 demethylation enzyme complex as well as the late biosynthetic protein, the C-24 sterol methyltransferase (Erg6p). *Biochim. Biophys. Acta* **1686**: 30–36.
- Moura, J.C., Bonine, C.A., de Oliveira Fernandes Viana, J., Dornelas, M.C., and Mazzafera, P. (2010). Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *J. Integr. Plant Biol.* **52**: 360–376.
- Myasoedova, K.N., and Berndt, P. (1990). Immobilized cytochrome P-450LM2. Dissociation and reassociation of oligomers. *FEBS Lett.* **270**: 177–180.
- Nair, R.B., Xia, Q., Kartha, C.J., Kurylo, E., Hirji, R.N., Datla, R., and Selvaraj, G. (2002). *Arabidopsis* CYP98A3 mediating aromatic 3-hydroxylation. Developmental regulation of the gene, and expression in yeast. *Plant Physiol.* **130**: 210–220.
- Nour-Eldin, H.H., Hansen, B.G., Nørholm, M.H., Jensen, J.K., and Halkier, B.A. (2006). Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for cloning PCR fragments. *Nucleic Acids Res.* **34**: e122.
- Nziengui, H., and Schoefs, B. (2009). Functions of reticulons in plants: What we can learn from animals and yeasts. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**: 584–595.
- Oda, Y., Mimura, T., and Hasezawa, S. (2005). Regulation of secondary cell wall development by cortical microtubules during tracheary element differentiation in *Arabidopsis* cell suspensions. *Plant Physiol.* **137**: 1027–1036.
- Ozalp, C., Szczesna-Skorupa, E., and Kemper, B. (2005). Bimolecular fluorescence complementation analysis of cytochrome p450 2c2, 2e1, and NADPH-cytochrome p450 reductase molecular interactions in living cells. *Drug Metab. Dispos.* **33**: 1382–1390.
- Peterson, J.A., Ebel, R.E., O'Keefe, D.H., Matsubara, T., and Estabrook, R.W. (1976). Temperature dependence of cytochrome P-450 reduction. A model for NADPH-cytochrome P-450 reductase: cytochrome P-450 interaction. *J. Biol. Chem.* **251**: 4010–4016.
- Praporski, S., Ng, S.M., Nguyen, A.D., Corbin, C.J., Mechler, A., Zheng, J., Conley, A.J., and Martin, L.L. (2009). Organization of cytochrome P450 enzymes involved in sex steroid synthesis: PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS IN LIPID MEMBRANES. *J. Biol. Chem.* **284**: 33224–33232.
- Ralston, L., and Yu, O. (2006). Metabolons involving plant cytochrome P450. *Phytochem. Rev.* **5**: 459–472.
- Rasmussen, S., and Dixon, R.A. (1999). Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* **11**: 1537–1552.
- Reed, J.R., and Backes, W.L. (2012). Formation of P450 · P450 complexes and their effect on P450 function. *Pharmacol. Ther.* **133**: 299–310.
- Ro, D.K., and Douglas, C.J. (2004). Reconstitution of the entry point of plant phenylpropanoid metabolism in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): Implications for control of metabolic flux into the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* **279**: 2600–2607.
- Runions, J., Brach, T., Kühner, S., and Hawes, C. (2006). Photoactivation of GFP reveals protein dynamics within the endoplasmic reticulum membrane. *J. Exp. Bot.* **57**: 43–50.
- Saravanan, R.S., Slabaugh, E., Singh, V.R., Lapidus, L.J., Haas, T., and Brandizzi, F. (2009). The targeting of the oxysterol-binding protein ORP3a to the endoplasmic reticulum relies on the plant VAP33 homolog PVA12. *Plant J.* **58**: 817–830.
- Schaeffer, A., Bronner, R., Benveniste, P., and Schaller, H. (2001). The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2;1. *Plant J.* **25**: 605–615.
- Schalk, M., Batard, Y., Seyer, A., Nedelkina, S., Durst, F., and Werck-Reichhart, D. (1997). Design of fluorescent substrates and potent inhibitors of CYP73As, P450s that catalyze 4-hydroxylation of cinnamic acid in higher plants. *Biochemistry* **36**: 15253–15261.
- Schenkman, J.B., and Jansson, I. (2003). The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol. Ther.* **97**: 139–152.
- Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., and Werck-Reichhart, D. (2001). CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* **276**: 36566–36574.
- Schoch, G.A., Morant, M., Abdulrazzak, N., Asnaghi, C., Goepfert, S., Petersen, M., Ullmann, P., and Werck-Reichhart, D. (2006). The meta-hydroxylation step in the phenylpropanoid pathway: A new level of complexity in the pathway and its regulation. *Environ. Chem. Lett.* **4**: 127–136.
- Schoch, G.A., Yano, J.K., Wester, M.R., Griffin, K.J., Stout, C.D., and Johnson, E.F. (2004). Structure of human microsomal cytochrome P450 2C8. Evidence for a peripheral fatty acid binding site. *J. Biol. Chem.* **279**: 9497–9503.
- Schuhegger, R., Nafisi, M., Mansourova, M., Petersen, B.L., Olsen, C.E., Svatos, A., Halkier, B.A., and Glawischng, E. (2006). CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiol.* **141**: 1248–1254.
- Scott, E.E., He, Y.A., Wester, M.R., White, M.A., Chin, C.C., Halpert, J.R., Johnson, E.F., and Stout, C.D. (2003). An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 13196–13201.
- Sevrioukova, I.F., Li, H., Zhang, H., Peterson, J.A., and Poulos, T.L. (1999). Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 1863–1868.
- Sparkes, I., Hawes, C., and Frigerio, L. (2011). FrontIERs: Movers and shapers of the higher plant cortical endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 658–665.
- Sparkes, I., Tolley, N., Aller, I., Svozil, J., Osterrieder, A., Botchway, S., Mueller, C., Frigerio, L., and Hawes, C. (2010). Five *Arabidopsis* reticulon isoforms share endoplasmic reticulum location, topology, and membrane-shaping properties. *Plant Cell* **22**: 1333–1343.
- Sparkes, I.A., Frigerio, L., Tolley, N., and Hawes, C. (2009). The plant endoplasmic reticulum: A cell-wide web. *Biochem. J.* **423**: 145–155.
- Srere, P.A. (1985). The metabolon. *Trends Biochem. Sci.* **10**: 109–110.

- Stöckigt, J., and Zenk, M.H.** (1975). Chemical synthesis and properties of hydroxycinnamoyl coenzyme A derivatives. *Z. Naturforsch. C* **30c**: 352–358.
- Subramanian, M., Tam, H., Zheng, H., and Tracy, T.S.** (2010). CYP2C9-CYP3A4 protein-protein interactions: Role of the hydrophobic N terminus. *Drug Metab. Dispos.* **38**: 1003–1009.
- Szczesna-Skorupa, E., Chen, C.D., Rogers, S., and Kemper, B.** (1998). Mobility of cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 14793–14798.
- Szczesna-Skorupa, E., and Kemper, B.** (2006). BAP31 is involved in the retention of cytochrome P450 2C2 in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **281**: 4142–4148.
- Szczesna-Skorupa, E., Mallah, B., and Kemper, B.** (2003). Fluorescence resonance energy transfer analysis of cytochromes P450 2C2 and 2E1 molecular interactions in living cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 31269–31276.
- Tolley, N., Sparkes, I., Craddock, C.P., Eastmond, P.J., Runions, J., Hawes, C., and Frigerio, L.** (2010). Transmembrane domain length is responsible for the ability of a plant reticulon to shape endoplasmic reticulum tubules *in vivo*. *Plant J.* **64**: 411–418.
- Van Leene, J., et al.** (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Syst. Biol.* **6**: 397.
- Van Leene, J., et al.** (2007). A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Proteomics* **6**: 1226–1238.
- Van Leene, J., Witters, E., Inzé, D., and De Jaeger, G.** (2008). Boosting tandem affinity purification of plant protein complexes. *Trends Plant Sci.* **13**: 517–520.
- Vogt, T.** (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant* **3**: 2–20.
- Winkel, B.S.** (2004). Metabolic channeling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 85–107.
- Yang, X.H., Xu, Z.H., and Xue, H.W.** (2005). *Arabidopsis* membrane steroid binding protein 1 is involved in inhibition of cell elongation. *Plant Cell* **17**: 116–131.

Plasticity of specialized metabolism as mediated by dynamic metabolons

Tomas Laursen¹, Birger Lindberg Møller^{1,2}, and Jean-Etienne Bassard¹

¹VILLUM Research Center for Plant Plasticity, Center for Synthetic Biology 'bioSYNergy', and Plant Biochemistry Laboratory, Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, 40 Thorvaldsensvej, DK-1871 Frederiksberg C, Copenhagen, Denmark

²Carlsberg Laboratory, 10 Gamle Carlsberg Vej, DK-1799 Copenhagen V, Denmark

The formation of specialized metabolites enables plants to respond to biotic and abiotic stresses, but requires the sequential action of multiple enzymes. To facilitate swift production and to avoid leakage of potentially toxic and labile intermediates, many of the biosynthetic pathways are thought to organize in multienzyme clusters termed metabolons. Dynamic assembly and disassembly enable the plant to rapidly switch the product profile and thereby prioritize its resources. The lifetime of metabolons is largely unknown mainly due to technological limitations. This review focuses on the factors that facilitate and stimulate the dynamic assembly of metabolons, including microenvironments, noncatalytic proteins, and allosteric regulation. Understanding how plants organize carbon fluxes within their metabolic grids would enable targeted bioengineering of high-value specialized metabolites.

Specialized metabolites and their infrastructure

Plants are sessile organisms and their growth and development is totally dependent on highly specialized biosynthetic capacities, such as photosynthesis and cell wall formation, and on the intimate interplay of multiple genetic and metabolic networks, which require a high degree of functional organization and infrastructure. Compartmentalization is an efficient way to separate cellular processes in eukaryotic cells. Within each compartment, proteins may be organized into functional units (modules), which, like electronic circuits, provide structured responses. Each biosynthetic pathway includes multiple modules, where the output of one serves as the input to the next [1–4]. Organization in functional units offers the opportunity to redirect the circuit by combining modules. Likewise, the plethora of plant specialized metabolites requires a sophisticated metabolic infrastructure. These metabolites are derived from primary metabolism with intermediates in the pathways for the synthesis of carbohydrate, amino acid, and lipid as precursor molecules. Specialized metabolites include a plethora of compounds with highly diverse functional properties and offer a way for the plant to communicate with other plants, deter

herbivores, attract pollinators, and facilitate adaptation to climatic change.

The cytochrome P450 (CYP) enzyme superfamily plays a crucial role in catalyzing the formation of a diversity of specialized metabolites, including terpenoids, phenylpropanoids, and alkaloids [5,6]. The classic CYP-catalyzed reaction involves substrate hydroxylation and uses molecular O₂ and two electrons [7]. Besides hydroxylation, CYPs may catalyze diverse reactions such as dehydration, isomerization, dimerization, decarboxylation, and reduction [8]. As catalysts of reactions that are often difficult to carry out by organic chemical synthesis, CYPs have attracted the attention of synthetic biologists. The rationale for using biological systems for the production of high value compounds versus classical organic chemical synthesis is a matter for debate between synthetic biologists and synthetic chemists [9]. The type II CYPs are anchored to the endoplasmic reticulum (ER) membrane with the globular domain facing the cytosol, and require electrons donated by the NADPH-dependent cytochrome P450 oxidoreductase (POR) [10]. The many biosynthetic pathways that include CYPs require fine organization. Furthermore, the biosynthesis of specialized metabolites typically requires the coordinated action of multiple enzymes, which would require the presence and availability of a highly complex intracellular mixture of substrates, intermediates, and products. To optimize metabolism, some biosynthetic pathways are organized as multienzyme complexes, metabolons, to facilitate swift processing and to avoid undesired metabolic crosstalk [4,11].

This review focuses on the factors stimulating metabolon formation. A detailed understanding of the mechanisms governing optimized metabolic flux is likely to play a crucial role in the engineering of biosynthetic pathways of lucrative compounds in the future to satisfy the desire to move towards a bio-based society. We provide an overview of the complexity of cellular metabolic highways facilitated by dynamic metabolons. Furthermore, we highlight factors that are likely to play essential roles in the regulation of metabolon assembly.

Organization of pathways generates metabolic highways

The organization of enzymes in modules or metabolons is an efficient way to direct metabolic processes. The metabolon concept was initially defined as complexes of sequential

Corresponding author: Møller, B.L. (blm@plen.ku.dk).

1360-1385/

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2014.11.002>

metabolic enzymes and structural elements [12–14]. According to this definition, sequential enzymes occur in close proximity, creating a microenvironment where substrates are successively transferred between enzymes, which results in high local concentrations or in direct transfer to the adjacent enzyme [12,14,15]. This provides intracellular metabolic highways where the production of compound D from substrate A circumvents free diffusion and equilibrium of the intermediates B and C (Figure 1). Hereby, the total flux increases significantly and simultaneously prevents leakage of labile and potentially toxic intermediates [4].

Metabolon assembly may directly regulate the flux and allosterically alter the efficiency of individual enzymes [16]. Protein interactions are thought to play a crucial role in metabolon formation and may be differentiated into obligate and non-obligate interactions [17]. Obligate interactions include complexes of homo- and hetero-oligomeric complexes where each individual protein is not able to catalyze a reaction. By contrast, non-obligate complexes involve interactions between proteins that may function independently. Non-obligate or transient complexes with dissociation constants in the micromolar range play a crucial role in cellular networks [18]. In the biosynthesis of specialized metabolites, metabolons are assumed to be dynamic, allowing regulated assembly and disassembly. This enables different combinatorial uses of the individual proteins, thereby expanding the product output profile [19]. Although the stability of such complexes may be functioning dependent [20,21], the regulation of assembly is most likely achieved through complex mechanisms, including protein–protein interactions and changes in microenvironments.

The organization of multiprotein complexes can be achieved by anchoring to small noncatalytic scaffold proteins with the sole purpose of bringing enzymes together [11,22,23], and allosterically stimulate the individual components [24]. In the synapse, post-synaptic density protein (PSD95)–*Drosophila* disc large tumor suppressor (Dlg1)–zonula occludens-1 protein (zo-1) (PDZ) domain-containing scaffold proteins are involved in organizing signaling complexes, binding of downstream effectors, and coordination with the cytoskeleton [25]. Owing to relatively weak binding

affinities, the association and dissociation is dynamic [26,27]. Scaffold proteins composed of multiple consecutive PDZ domains, supramodules, are capable of guiding the assembly of multiprotein complexes by bringing them together or by stabilizing already established interactions [25]. In plants, only a few studies have focused on PDZ domain scaffold proteins and the identification of motifs [28]. The chloroplast Deg proteases involved in protein quality control, specifically of photodamaged photosynthetic subunits [29], are known to organize in hexamers stabilized by PDZ domains [30]. The existence of synthetic scaffold proteins in plants may be used by synthetic biologists to force enzymes together *in vivo* using bioengineering, as well as *in vitro* as experimental tools to gain insight about the consequences of organizing enzymes in a sequential manner. In glycolysis and gluconeogenesis, three enzymes, triosephosphate isomerase, aldolase, and fructose 1,6-bisphosphatase, sequentially convert glyceraldehyde 3-phosphate into fructose 6-phosphate. The aldolase and fructose 1,6-bisphosphatase has been shown to form a dynamic metabolon *in vivo* [31]. A synthetic scaffold protein binding all three enzymes based on high-affinity interactions between dockerin and cohesins resulted in almost 50 times increased reaction rates compared with their individual turnover rates [32]. Similar mechanisms are likely to be involved in controlling cell metabolism.

Allosteric regulation: it's all about protein chemistry

Enzymes are dynamic chemical catalysts constantly undergoing local folding or unfolding events [33]. Structural disorder at one site may affect the properties of regions distal to the effector site via amino acid energy networks [34]. Amino acid and domain flexibility gives rise to an ensemble of conformations that oscillates at multiple time-scales associated with functional properties [35]. Single molecule enzyme activity studies have revealed the existence of multiple catalytic states, indicating that enzymes behave as individuals [36,37]. These catalytic states may be linked to the conformational ensemble of enzymes. Single molecule resolution is thus required to understand the detailed function and dynamics of enzymatic processes, which remain masked in bulk studies. The behavior of

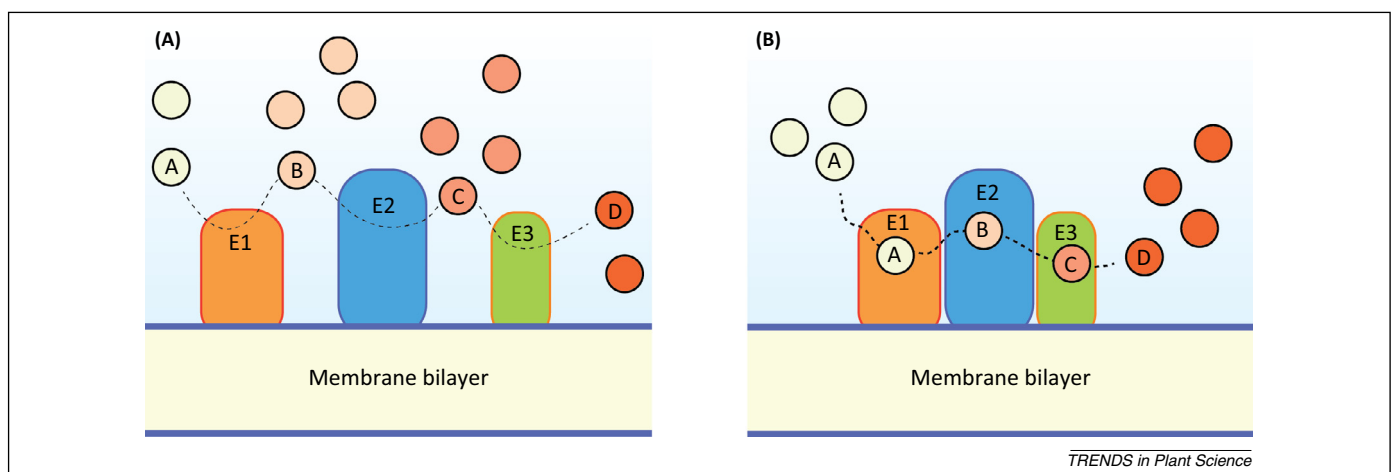


Figure 1. Illustration of the conversion of substrate A to product D with intermediates B and C. The membrane serves as a scaffold for organizing the enzymes E1, E2, and E3. The sequential conversion is speculated to follow independently with the intermediates freely equilibrating with the bulk (A), or through the formation of metabolons channeling substrate A towards product D without free equilibration of the intermediates (B).

enzymes may be shifted towards more or less active states by inducers or inhibitors, respectively. Allosteric regulation is an important mechanism for protein regulation, which is closely related to catalysis [38]. Allosteric regulation is the mechanism of effector binding distal to the active site, facilitating a change in catalytic function. Ligand binding, protein interactions, solvent effects, and mutations can mediate allosteric regulation. Consequently, redistribution of the conformational equilibrium and the rates of interconversion may have a dramatic effect on the catalytic properties [38]. Metabolon formation involves protein–protein interactions and organization on structural elements [12–14], both of which have the capacity to allosterically stimulate catalytic rates. CYP-based metabolons are anchored to the ER membrane and are dependent on electron transfer from POR. The tertiary structure of POR is highly conserved between eukaryotic species [39]. Both POR and CYPs are dependent on conformational motion for catalysis. The conformational flexibility of the substrate entry channel of CYPs provides a cleft from the surface to the heme iron, possibly via the ER membrane, and may also be involved in defining substrate specificity [40]. Only a few studies have provided evidence for post-translational regulation of CYPs, such as phosphorylation and glycosylation, and their possible importance with regard to functional properties [41]. However, some members of the CYP2 subfamily are known to be regulated by phosphorylation [42]. Upon phosphorylation, the enzymes become inactive, thereby functioning as a fast catalytic switch with high specificity [43]. The involvement of post-translational regulation in metabolon formation needs to be investigated in much more detail before general conclusions about their importance are justified.

Besides functional modifications, structural flexibility plays a crucial role in the functional properties of proteins. POR was initially crystallized in a closed conformation optimal for inter-flavin electron transfer between the FAD and FMN coenzymes [44]. In the closed conformation the FMN coenzyme remained inaccessible to CYP interaction. Electron transfer to the CYP heme group requires a dramatic conformational change of POR. Accordingly, *in vivo*, POR exists in equilibrium between the open and closed states. The conformational equilibrium between the open and closed state gating POR function [45,46] differed between enzymes reconstituted in a bilayer [47] and the soluble version [48]. The conformational landscape of POR has been hypothesized to regulate catalysis and to be involved in controlling CYP specificity [46,49]. Membrane anchoring probably serves to position the proteins in relation to each other and thereby regulates electron transfer. Besides the membrane environment, the aqueous environment is known to affect catalytic rates either by altering substrate solubility or by directly changing the functional properties of the enzyme. Electron transfer and conformational gating of POR are affected by ionic strength, implying electrostatic sensitivity [37,46,50]. Furthermore, single point mutations in human POR showing altered allosteric regulation have been found to cause disordered steroidogenesis [51] and skeletal dysplasia [51–53]. The observed different activity for each mutant was highly dependent on the CYP variant employed, and the severity of the altered

allosteric regulation on disease development was not detected by the conventional Cyt C assay [51–57]. A significant number of the mutations causing the disorders are not involved in flavin binding or positioned at the CYP interface. Hence, the altered activity may be explained by an allosteric structural change leading to a distorted electrostatic POR–CYP interaction [44,58,59], supporting the hypothesis of a conformational gated selectivity mechanism [46]. This mechanism is likely to affect the recently described functional states of POR. POR was shown to oscillate between a slow and a fast activity state with turnover rates of 11 and 210 molecules per second, respectively [37]. Hence, allosteric regulation of POR seems to be a key mechanism for activation and specificity, and may be crucial for its participation in dynamic metabolons.

Besides POR, other membrane-anchored redox partners may be recruited to CYP complexes. Cyt b_5 is a small heme protein anchored to the ER membrane system. Although Cyt b_5 is not essential for CYP activity *in vitro*, it is known to be involved in CYP reactions with varying functions [60] with the ability to provide the second electron of the CYP catalytic cycle [61]. Cyt b_5 has also been shown to form 1:1 complexes with CYPs [61] and, thereby, allosterically stimulate specific CYPs by decreasing the K_m values for several substrates [62,63]. Reconstitution of Cyt b_5 with the multifunctional CYP17A1, catalyzing a hydroxylation and lyase reaction in steroid biosynthesis, specifically stimulated the lyase reaction, resulting in an altered product profile [64]. Electron transfer was not required for the observed stimulation and, therefore, interpreted as an allosteric effect of Cyt b_5 interaction with CYP17A1 and POR.

Allosteric regulation of CYPs may involve multiple binding sites and substrate cooperativity. CYP3A4, the main enzyme involved in the detoxification of a broad variety of chemicals in the human liver, has been crystallized with two substrate molecules in the binding pocket [65]. Studies of CYP3A4 reconstituted in artificial membrane discs in the form of nanodiscs [66–68], suggested the binding of a third substrate molecule involved in homotropic cooperativity [69,70]. The evidence points towards an allosteric binding of the third substrate molecule distant from the active site [71]. This observation is in line with the flexibility of several CYPs upon substrate binding [72–74]. Cooperative substrate binding is, therefore, likely to regulate the conformational dynamics of particular CYPs and, thereby, catalysis [75].

A major concern regarding CYP activation is the stoichiometric imbalance of POR enzymes relative to CYPs, with a 5–20 surplus of the CYPs [76,77]. The stoichiometric imbalance may be counteracted by oligomerization of CYP enzymes. Homo- and hetero oligomerization play an important role in the functional properties of many CYPs [78]. Reconstitution of CYP1A2 and CYP2B4, two CYPs involved in xenobiotic metabolism, either separately or jointly in liposomes, revealed the importance of physical interaction between the CYPs [79]. Co-reconstitution of CYP1A2 and CYP2B4 increased turnover rates of 7-ethoxyresorufin by 66%, catalyzed mainly by CYP1A2, compared with separately reconstituted enzymes [79]. Similarly, CYP3A4 has been shown to form homo-oligomeric structures under

physiological conditions, again affecting its kinetic behavior [80,81].

Microenvironments guide proteins and metabolites

Although the physical segregation of enzymatic reactions is an important way of maintaining order and may be accomplished by compartmentalization, spatial organization of sequential metabolic enzymes is a prerequisite for efficient turnover [12–14,82]. Some pathways are divided into functional units localized in different organelles, for example, terpenoid and morphine alkaloid biosynthesis. The diterpenoid backbone structure is synthesized in the chloroplasts whereas decorations, mainly hydroxylations catalyzed by CYPs, are localized on the cytosolic surface of the ER membrane system [83–85]. Coupling between organelles may be facilitated by fusion of the ER and the outer chloroplast membrane via anchoring proteins, and serve to guide the transport of hydrophobic intermediates in the membrane bilayer [86]. This offers a new dimension in the organization of metabolic processes, with membrane systems functioning as carriers of hydrophobic biosynthetic modules. Synthetic biology approaches have been used to couple specialized metabolite biosynthesis to the photosynthetic complexes within the chloroplasts [87–89]. Coupling of the CYP-catalyzed hydroxylation steps of diterpenoid pathways directly to the photosynthetic complexes is envisioned to provide easier access. Within the chloroplasts, the precursor core structures are already produced by terpenoid synthases. Simultaneously it is possible to use sunlight as an energy source instead of the sparse pool of intracellular chemical energy (e.g., in the form of the reducing equivalents of NADPH).

A direct consequence of the requirement for metabolic organization, is the establishment of microenvironments derived from solvent effects and the structural components present. Organization of protein complexes may be facilitated by protein–protein and protein–membrane interactions. Membrane proteins, and especially CYPs, have been proposed to serve as nucleation sites for metabolon formation, including cytosolic soluble proteins [4,11]. Bringing enzymes together at the membrane surface is thought to be important with respect to orienting and properly positioning the proteins in relation to each other, and would also increase the collision efficiency by restricting diffusion to the 2D lattice. Lateral diffusion in membranes is slower compared with diffusion in aqueous solutions owing to higher viscosity, which may be affected by, for example, lipid composition and temperature. This might be crucial for the establishment of both the solvent and membrane microenvironments required for efficient substrate channeling. The membrane microenvironment may include particular lipids with functional or charged headgroups, resulting in the formation of domains with altered electrostatic charges. In addition, phase transition and membrane microdomains facilitated by the presence of sterols and sphingolipids are hypothesized to be involved in organizing enzymes [90]. Increasing evidence suggests that membrane charge and sterol content stimulate the POR–CYP interaction [91–93], which could be involved in the specific activation and recruitment of particular CYPs for interaction with POR.

Cells are mainly composed of two solvent environments, namely the hydrophilic aqueous phase and the hydrophobic lipid bilayer (membrane) phase. However, deep eutectic solvents have been proposed as a third solvent, playing key roles in the adaptation to environmental stresses such as cold, salt, and drought [94]. Deep eutectic solvents are mixtures of organic solids that, when present in the right proportions, form a liquid with a significantly lowered melting temperature compared with its individual components [95,96]. Synthetic deep eutectic solvents still suffer from melting points above room temperature and, therefore, are not of direct physiological relevance. However, the abundance of primary metabolites such as sugars and various carboxylic acids capable of forming liquids in the absence of or with negligible amounts of water has prompted a focus on the importance of the natural occurrence of such solvents in plants [94,97,98]. In general, deep eutectic solvents contain high molar amounts of sugars, selected amino acids, choline, and organic acids such as malic, citric, lactic, and succinic acids. These compounds are typically present in large molar quantities indicating that they may have important functions such as offering cryoprotection or contributing to the ability of plants to resist drought stress rather than being considered as accumulated intermediates [94,99]. Likewise, to keep specialized metabolites present at high concentrations in solution may require alternative solvents to avoid toxicity and precipitation. Many plants produce large amounts of anthocyanin pigments. In several cases, anthocyanin inclusions in the vacuole of petal cells have been found at higher levels than would be possible in water [100,101]. Likewise, the solubility of some flavonoids has been shown to be 50–100 times higher in natural deep eutectic solvents compared with water [94]. Interestingly, preservation of enzymatic activities may also be favored in eutectic solvents [102,103]. This implies that particular enzymes may remain functional when embedded within these solvent microenvironments. The formation of metabolons and their higher order clustering might involve formation of a solvent microenvironment with increased solubility of products and adsorption of substrates. Organization of metabolons at a membrane interface could also include the choline headgroup of lipids, which are known to efficiently form deep eutectic solvents [95] (Figure 2). Such microenvironments, including lipid bilayers, enzymes, and specialized metabolites, may assist in the channeling of labile and volatile intermediates given that the vapor pressure in deep eutectic solvents is negligible. Furthermore, biosynthesis of specialized metabolites in concentrations above solubility in water may be obtained within these solvents (Figure 2).

Phenylpropanoid pathways: a highly complex metabolic grid to control

A large proportion of the carbon flux and energy generated by photosynthesis enters the shikimate pathway and is directed towards synthesis of phenylpropanoids, a highly diverse class of soluble specialized metabolites [104]. Phenylpropanoid synthesis is organized in a metabolic grid of sub-pathways where gene expression is tightly coordinated in each branch [105]. In 1974, Helen Stafford suggested

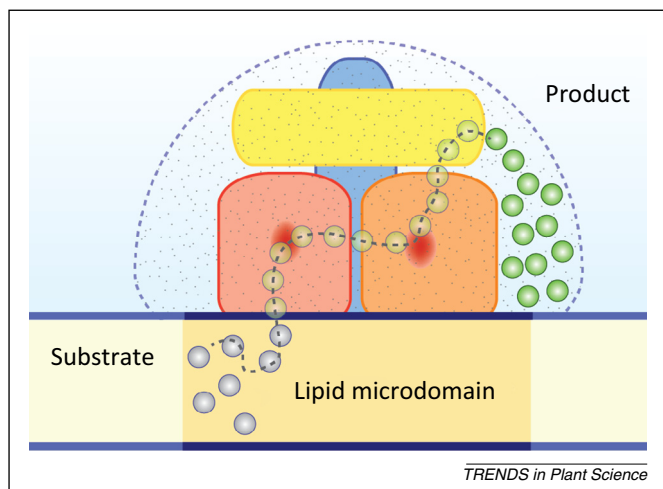


Figure 2. Metabolon formation involving microenvironments. The CYP-based metabolons are anchored to the membrane with their catalytic sites facing the cytoplasmic surface, allowing interaction with soluble enzymes. Metabolon formation might involve membrane microdomains and a solvent microenvironment, which allows accumulation of substrates and products above their solubility in water and simultaneously prevents leakage of labile and volatile intermediates. Substrates include both hydrophilic compounds entering the metabolon via the aqueous phase and hydrophobic compounds entering via the membrane. Hence, the membrane environment serves to regulate substrate access, assembly, and the stability of the complexes.

that many of the enzymes belonging to this metabolic grid are organized in one or more enzymatic complex to facilitate coordinated synthesis of the many different specialized phenylpropanoids [106]. In this system, the metabolic channeling resulting from metabolon formation is not only considered to be a means of sequestering labile or toxic intermediates, but also of controlling carbon and energy flow between the numerous metabolic pathways, which based on the same precursors operate in parallel and concurrently in the cell [4].

The core phenylpropanoid pathway involves two soluble enzymes, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and 4-coumarate:CoA ligase (4-CL), and one CYP73 enzyme (cinnamic acid 4-hydroxylase, C4H) converting phenylalanine into activated *p*-coumaroyl CoA (Figure 3). Substrate channeling within this core phenylpropanoid pathway and association of PAL with membranes prepared from potato tubers provided the first indications of the involvement of a multienzyme complex in the control of the initial steps of phenylpropanoid biosynthesis [107,108]. Co-localization of PAL and C4H is necessary for efficient channeling of intermediates [109]. Activated *p*-coumaroyl CoA is then channeled into the multiple branched pathways of the metabolic grid, resulting in controlled formation of flavonoids, isoflavonoids, anthocyanins, tannins, coumarins, stilbenes, phenolamides, phenolic esters, phenolic cyanogenic glucosides, and lignin (Figure 3). All these pathways include at least one CYP enzyme, which has been proposed to anchor the soluble proteins catalyzing the remaining steps of the particular biosynthetic pathway and, thereby, initiate the formation of the metabolon [15].

Strong evidence of metabolic channeling occurs in the flavonoid branch with respect to the carbon flux assignment to flavonoid, isoflavonoid, anthocyanin, and proanthocyanidin formation. For example, flavonol synthase 1

(*FLS1*) knockout plants accumulate anthocyanins at twice the levels observed in wild type plants, indicating that precursors normally channeled to flavonoids are instead used for anthocyanin synthesis [110,111] (Figure 3). The anthocyanidin synthase (ANS) exhibits high FLS activity *in vitro* [112], but *in planta*, it cannot access the dihydroflavonols available in the absence of FLS1. ANS seems only to associate with dihydroflavonol-4-reductase (DFR), which by channeling provides substrates directly to ANS. The carbon flux towards flavonoid and anthocyanin formation was demonstrated to be controlled by the competitive enzyme interactions of FLS1 and DFR towards chalcone synthase (CHS) [113] (Figure 3). One apparent common feature of metabolon formation is relocalization of soluble enzymes to membrane surfaces: for example, this has been shown for the isoflavone *O*-methyltransferase from *Medicago sativa*, which relocalizes to the surface of the ER upon elicitation of the isoflavonoid pathway [114].

In the lignin branch of phenylpropanoid metabolism, the initial steps convert *p*-coumaroyl CoA to caffeoyl shikimate or caffeoyl quinate catalyzed by two enzymes, a hydroxycinnamoyl CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase (HCT) and a CYP98A (*p*-coumaroylshikimate 3'-hydroxylase, C3'H; Figure 3). Both soluble 4-CL and HCT show a CYP-dependent relocalization from the cytosol towards the ER membrane upon expression of C4H and C3'H [115]. The metabolon formed is dynamic [115]. The CYP enzyme interacts with a specific set of ER-resident proteins involved in ER maintenance and sterol and lipid homeostasis [115], pointing to the importance of the membrane microenvironment for metabolon formation. The CYPs involved seem to homo- and hetero-oligomerize [115,116], maybe to improve metabolic flow and the relocalization of soluble enzymes. In black cottonwood (*Populus trichocarpa*), the formation of a tetramer composed of three subunits of 4-CL3 and one of 4-CL5 affects the direction and rate of metabolic flux for lignin biosynthesis, with 4-CL5 playing a regulatory role [117].

The occurrence of metabolic channeling in the phenylpropanoid pathway was proposed decades ago and ever since has been a subject of debate [118–120]. However, *in vitro*, many of the enzymes displayed lack of substrate specificity, which points to substrate channeling *in vivo* via metabolon formation as an important means of control. Furthermore, phenylpropanoid metabolism remains a complex metabolic grid that is slightly differently controlled between plant species and that is modulated by environmental challenges. Thus the configuration of this metabolic grid of branched pathways requires continuous modifications, as exemplified by the discovery of a step involving a caffeoyl shikimate esterase (CSE) enzyme in thale cress (*Arabidopsis thaliana*) [121]. The genetic modification of a single step resulted in dramatic pleiotropic defects [122–125]. Thus, the metabolic grid for phenylpropanoid synthesis, derived from a few common precursors, illustrates the complexity and necessity for a well-organized metabolic infrastructure. Studies in different plant species have provided strong evidence for the environmental impact on the metabolic fluxes within the grid influencing the coordinated gene and protein expression, the regulation of fluxes into sub-branches by transcription

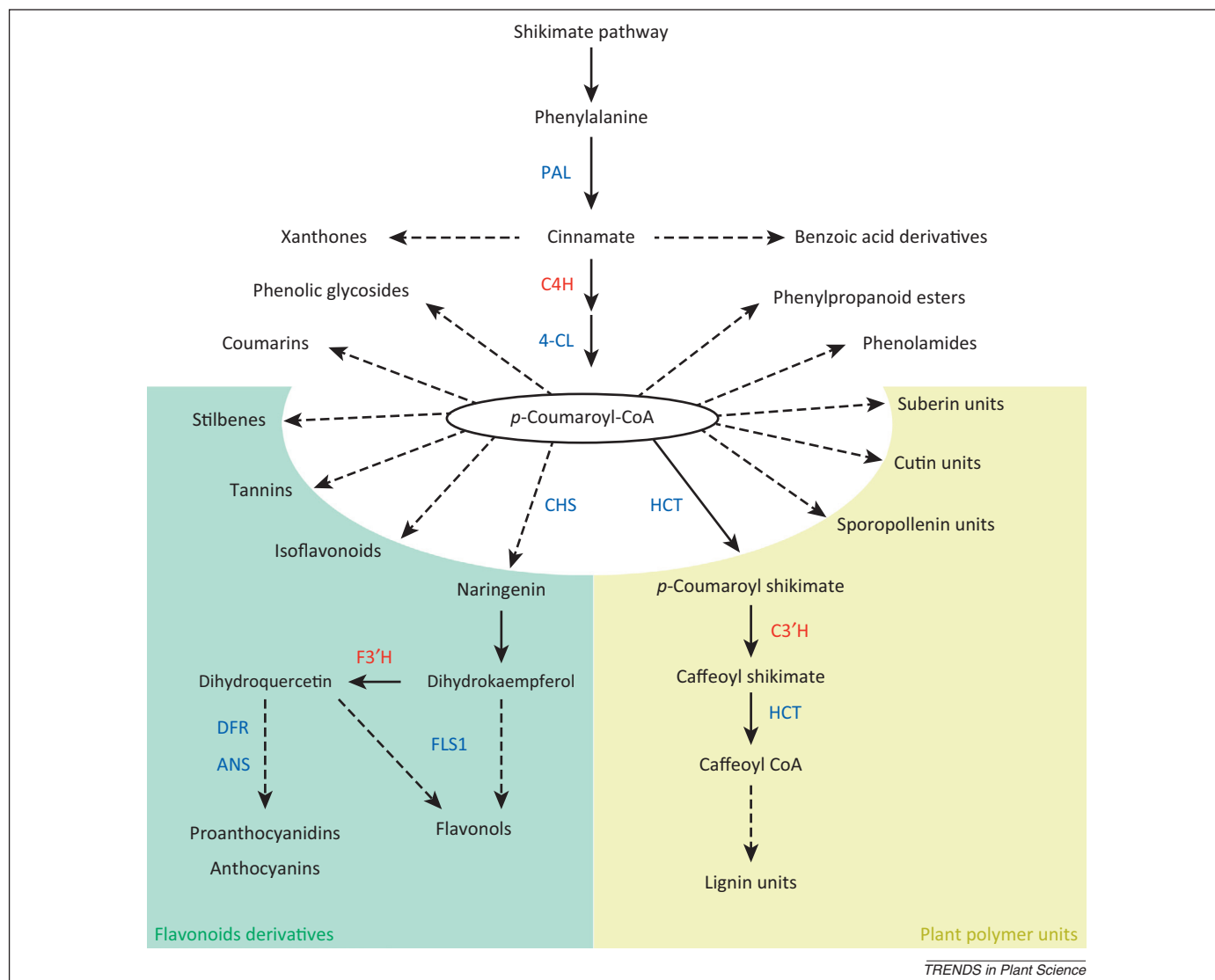


Figure 3. Schematic representation of the phenylpropanoid pathway derived from the aromatic amino acid phenylalanine. Coumaroyl-CoA is the last common intermediate shared by various branches leading to a high diversity of metabolites. The fate of intermediates is thought to be dependent on complex dynamic metabolic highways, including metabolon formation. Enzymes are colored blue or red indicating, respectively, soluble or membrane bound. Abbreviations: ANS, anthocyanidin synthase; C3'H, *p*-coumaroylshikimate 3'-hydroxylase (CYP98A); C4H, cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A); CHS, chalcone synthase; 4-CL, 4-coumaric acid CoA ligase; DFR, dihydroflavonol 4-reductase; F3'H, flavonoid 3'-hydroxylase (CYP75B); FLS1, flavonol synthase 1; HCT, hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyl transferase; PAL, phenylalanine ammonia lyase. Broken arrows indicate multistep reactions.

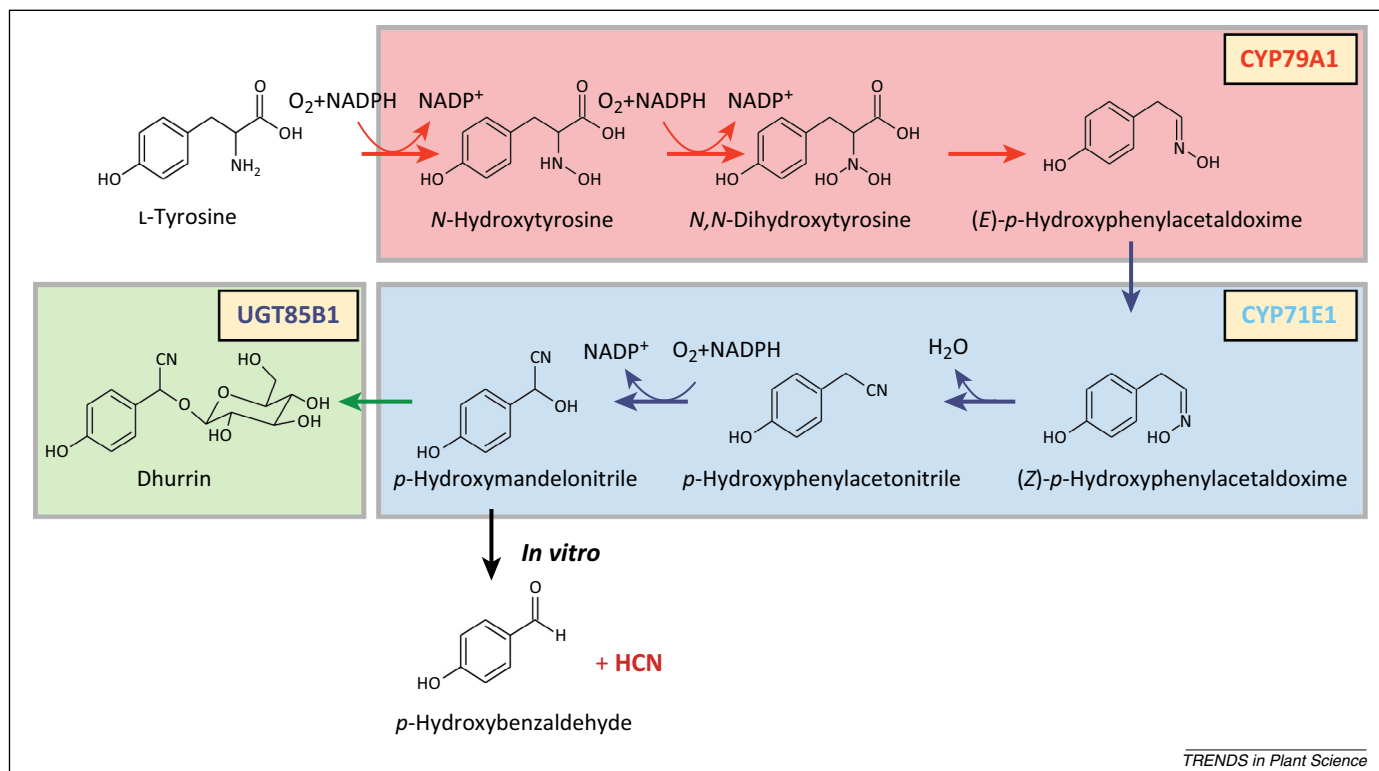
factors, and transcript stability, protein stability, and protein activation [126–130]. Channeling of intermediates, membrane association of soluble enzymes, and physical interaction of enzymes for the formation of metabolons constitutes a final element of fine tuning of the metabolic flux.

Cyanogenic glucosides: a case study involving dynamic metabolons

Cyanogenic glucosides belong to the class of specialized metabolites assigned as phytoanticipins [131,132]. They have a main function as bio-pesticides and act by releasing toxic hydrogen cyanide upon tissue disruption. The L-tyrosine-derived cyanogenic glucoside dhurrin was initially isolated and characterized in broomcorn (*Sorghum vulgare*) [133]. The content of dhurrin reaches a maximum in 3-day-old etiolated seedlings and constitutes up to 30% of the dry weight in the seedling tips [134]. Biosynthesis of dhurrin involves two membrane-anchored CYP enzymes

(CYP79A1 and CYP71E1) [135–140], POR [141], and a soluble UDP-glucosyl transferase (UGT85B1) [142,143]. This pathway is similarly organized in other cyanogenic plants [144–146]. Although catalyzed by only a few enzymes, numerous intermediates are involved in the dhurrin pathway (Figure 4). *In vitro*, *p*-hydroxymandelonitrile (cyanohydrin) formed from tyrosine by the action of CYP79A1 and CYP71E1 spontaneously dissociates to *p*-hydroxybenzaldehyde and HCN. *In vivo*, the cyanohydrin is stabilized by UGT85B1 catalyzed glucosylation to produce dhurrin (Figure 4) [147–149].

Biosynthesis of cyanogenic glucosides is thought to involve metabolon formation. Upon activation, CYP79A1, CYP71E1, and POR recruit the soluble UGT85B1 to the ER surface and organize into a multienzyme cluster. Early biosynthetic studies using microsomal preparations from etiolated *Sorghum bicolor* seedlings and administration of dual stable isotope-labeled precursors revealed tight



TRENDS in Plant Science

Figure 4. The biosynthetic pathway of the cyanogenic glucoside dhurrin. In the endoplasmic reticulum, cytochrome P450 oxidoreductase (POR) catalyzes the transfer of reducing equivalents from NADPH to cytochrome P450 (CYP)79A1 and CYP71E1. The first committed step in the biosynthesis of dhurrin is mediated by CYP79A1, which converts tyrosine into *p*-hydroxyphenylacetaldoxime (oxime). This intermediate is further converted to *p*-hydroxymandelonitrile (cyanohydrin) by the action of CYP71E1. *In vivo*, the cyanohydrin is glucosylated by UGT85B1 to form dhurrin, which is the final product.

substrate channeling [150,151]. Confocal microscopy was applied to detect co-localization of an UGT85B1–YFP fusion protein with co-expressed CYP79A1 and CYP71E1 at the ER surface of transgenic *Arabidopsis* plants [152]. Both CYP79A1 and CYP71E1 retained their individual activities upon C-terminal fusion with fluorescent proteins. However, plants infiltrated with CYP79A1–YFP, CYP71E1–CFP, and UGT85B1 did not produce dhurrin, which was attributed to unsuccessful coupling between CYP79A1 and CYP71E1 when these were simultaneously fused to a fluorescent protein [152].

Transgenic expression of the dhurrin enzymes in *Arabidopsis* demonstrates the plasticity of dynamic metabolons and metabolic infrastructure in general. *Arabidopsis* is acyanogenic but produces glucosinolates, which are structurally related defense compounds. Glucosinolates and cyanogenic glucosides are both derived from amino acids with an oxime intermediate, the formation of which is catalyzed by an enzyme of the CYP79 family [153–155]. *Arabidopsis* produces methionine, tryptophan and phenylalanine-derived glucosinolates and the biosynthetic pathways are also thought to form metabolons [156]. Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the *S. bicolor* CYP79A1 gene were able to adopt the tyrosine-derived aldoxime not normally present in *Arabidopsis* into its glucosinolate metabolism, resulting in the production of the tyrosine-derived glucosinolate *p*-hydroxybenzylglucosinolate [157]. Transgenic expression of both CYP79A1 and CYP71E1 genes resulted in severely stunted plants accumulating numerous detoxification products derived from liberated pathway intermediates, but no dhurrin, and only minute amounts of the tyrosine-derived

glucosinolate. Expression of the entire dhurrin pathway resulted in the accumulation of dhurrin without any cross-talk with glucosinolate biosynthesis and a phenotype conferring a novel resistance to flea beetles (*Phyllotreta nemorum*) [157–159]. These observations document tight enzymatic coupling among the sorghum enzymes upon assembly of the entire dhurrin metabolon. Furthermore, the ability of the glucosinolate pathway to adopt and metabolize a novel oxime to the corresponding glucosinolate suggest that these pathways are dynamic and adaptable [19]. Both pathways are tightly regulated with high amino acid substrate specificity, whereas the oxime metabolizing enzymes possess less stringent specificities [105,160]. The E-oxime intermediate constitutes the last common intermediate in cyanogenic glucoside and glucosinolate formation (i.e., the point of bifurcation between the two pathways). This intermediate might serve as a branchpoint of multiple pathways. The finding that the tryptophan-derived indole-3-acetaldoxime serves as a precursor of camalexin, a potent antimicrobial compound, supports this hypothesis [161]. In addition, the broad substrate specificity of the oxime metabolizing enzymes may indicate that these enzymes are involved in other biosynthetic pathways. Glucosinolates and cyanogenic glucosides are generally considered to be plant defense compounds that are highly effective towards generalist insects. However, increasing evidence suggests that both pathways may respond to fungal and microbial attack by releasing intermediates or by processing the degradation products [19,162–164]. Transient assembly of metabolons is a prerequisite for dynamic metabolic highways determining the fate of substrates [19].

The lipid environment plays a crucial role in the kinetics of the dhurrin pathway. Reconstitution of CYP79A1 and POR in liposomes prepared with a variety of simple lipids revealed that dilauroylphosphatidylcholine (DLPC) lipids increased the turnover rates by more than four times that of any other lipid tested [140]. Besides the regulatory effect of the lipid composition, the endomembrane systems also play a role in segregating biosynthesis and degradation of dhurrin. Dhurrin and the specific β -glucosidases may be separated in different tissues, cells, or intracellular compartments [165]. Tissue disruption by chewing insects mediates interaction with β -glucosidase and degradation of dhurrin, ultimately resulting in the release of toxic hydrogen cyanide.

Purinosome studies reveal extreme regulated mechanisms

The complex regulation of dynamic metabolons is well exemplified by the purine biosynthetic pathway (Figure 5). Not only are purines essential building blocks in DNA and RNA, but they are also involved in signaling and energy storage. In healthy tissue, the salvage pathway maintains intracellular nucleotide pools by recycling. During DNA replication of differentiating cells, the *de novo* pathway synthesizes new purines. *De novo* biosynthesis has a great impact on cell growth and is consequently closely linked to uncontrolled cell growth of malignant tissue. Therefore, the *de novo* purine pathway has evolved tight regulatory mechanisms of overlapping catalytic and catabolic pathways to control the intracellular purine pools [166] and has been the target of a large number of drugs [166,167]. *De novo* purine biosynthesis involves the formation of inosine monophosphate, a

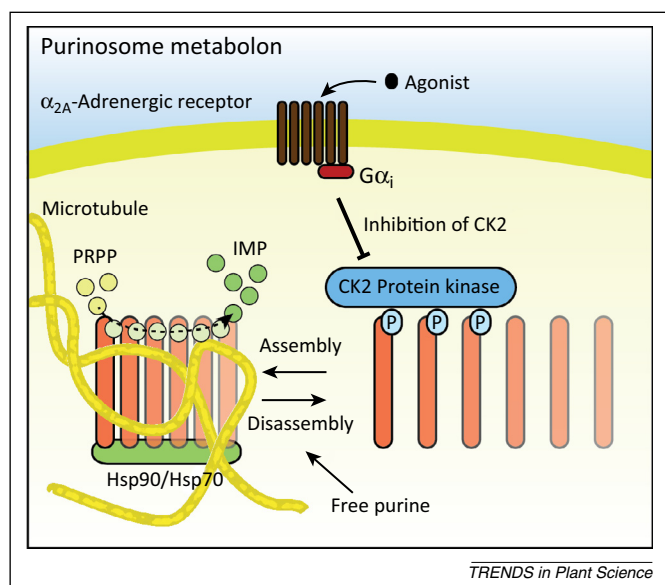


Figure 5. Purinosome assembly and disassembly regulation. *De novo* purine biosynthesis involves six enzymes (orange) catalyzing the conversion of phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) to inosine monophosphate (IMP). The purinosomes are organized in metabolons, and are regulated at multiple layers. Assembly is stimulated by depletion of free purines and via G-protein coupled receptor (GPCR) signaling cascades of the α_{2A} -adrenergic receptor. Assembled purinosomes are stabilized along microtubule fibers and multiple chaperone proteins, including Hsp70 and Hsp90. Disassembly is controlled by phosphorylation catalyzed by the protein kinase CK2 and free purines via feedback mechanisms. Abbreviations: $G\alpha_i$, a heterotrimeric G protein subunit that inhibits the production of cAMP from ATP..

precursor of adenine and guanine, from phosphoribosylpyrophosphate in 10 steps catalyzed by six enzymes [168]. The enzymes organize as functional multienzyme complexes termed purinosomes, with the first three enzymes forming the core structure [169]. However, all six enzymes have been shown by dual labeling experiments to organize in clusters in the cellular cytosol [170]. Reversible disassembly and assembly was achieved by incubation in purine-rich or -depleted media, respectively, thus displaying regulation by feedback mechanisms [170]. Several reports argue against absolute channeling within the purinosome even though some of the enzymes are multifunctional [171,172] and the intermediate unstable [173]. Although the catalytic rates by which intermediates were converted correlated with increased local concentrations, exogenously supplied intermediates could freely equilibrate [171]. Leakage of intermediates *in vivo* might be prevented by the formation of microenvironments, including multiple purinosomes. Pull-down studies have revealed the association of heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 with purinosomes, possibly involved in stabilizing the complexes or in the formation of multipurinosome clusters [174]. Hsp70 and Hsp90 are chaperone proteins commonly involved in protein folding and stabilization. Furthermore, both Hsp70 and Hsp90 are known to associate with multiple regulatory co-chaperones that co-localize with intracellular membrane systems and the cytoskeleton, and might be involved in assembly of multiprotein complexes [175,176]. This is consistent with the organization of purinosome clusters along the microtubule filaments, which serve as structural scaffolds [177]. Another interesting aspect is the regulation of dynamic protein complexes by extracellular stimuli. Signaling cascades affect a broad range of intracellular processes, many of which still remain masked. However, regulation of purinosome assembly has been shown to be G-protein coupled receptor (GPCR)-signaling dependent. Adrenergic receptor (AR) agonist binding of the α_{2A} -AR but not β_2 -AR stimulated purinosome assembly via the inhibitory heterotrimeric G protein subunit $G\alpha_i$ protein signaling cascade [178]. The kinase cascade associated with agonist binding may explain this effect. Phosphorylation of the three core enzymes involved in inosine monophosphate biosynthesis by the protein kinase CK2 results in disassembly [179]. The $G\alpha_i$ activation leading to a downstream signaling kinase cascade has been proposed to include phosphorylation and deactivation of CK2 and, thereby, indirectly stimulate purinosome assembly [178]. These complex regulatory mechanisms illustrate how intracellular networks have evolved to adapt to environmental conditions (Figure 5). Hence, lessons learned from the dynamic assembly and disassembly of purinosome clusters are likely to be transferred to other metabolons. One of the interesting aspects is the formation of multipurinosome clusters that nucleate with structural elements and chaperone proteins. It is not known whether this is a common feature of metabolons and the consequence of substrate access, product trafficking and catalytic efficiencies.

Concluding remarks and future perspectives

Although multiple studies have focused on the formation of metabolons involving CYP enzymes, it is still unknown how the dynamic assembly of such complexes is regulated.

The stoichiometry, stability, and dynamics of such complexes have yet to be resolved, mostly owing to lack of proper techniques. Factors that are likely to regulate the dynamic assembly process include the membrane and solvent environment, noncatalytic proteins, signaling pathways, and higher order clustering. Post-translational modifications have been shown to modulate enzymes of the phenylpropanoid pathway. Phosphorylation of a specific threonine residue of PAL, results in a decrease in catalytic rate [180]. It remains unknown whether this affects the catalytic properties of PAL or the assembly of the metabolon as observed for the purinosome complex (Figure 5). All these factors may allosterically stimulate the function and efficiency of the pathways and ultimately control the metabolite profile obtained.

Several promising techniques are being developed or advanced, which should enable more precise studies of these transient structures. Detergent-free approaches for the solubilization and isolation of intact complexes should provide novel insights into the organization and identification of interaction partners. The copolymer of styrene and maleic acid has successfully been used to extract and purify membrane proteins directly from intact membranes [181,182] and, in a few cases, of intact membrane complexes [183]. Analyses of such complexes are likely to involve advanced approaches for solution-based structural techniques, such as small angle scattering. Such techniques have successfully been applied for the characterization of single membrane proteins reconstituted in nanoscale discoidal lipid discs, or nanodiscs [184]. Advanced mass spectrometry allows the identification of intact protein complexes [185] and associated essential lipids [186]. Recently, *in planta* fluorescence resonance energy transfer (FRET) based microscopy techniques were applied for resolving protein–protein interactions [113,115,187]. These methods allow the mapping of interactions *in planta* by pairwise combinations of fluorescently tagged proteins. Furthermore, these techniques could also monitor the effect of co-expressed untagged proteins (putative partners or competitors) on the tested pair [113,115]. Likewise, improving temporal and spatial resolution of microscopy-based approaches should allow direct observations of the dynamic assembly process.

These complex structures are transient assemblies, relying on delicate local changes in solutes and structural elements and possibly scaffolding proteins. The knowledge obtained by unraveling the mechanisms regulating assembly and disassembly is crucial for understanding metabolic flux and for successful optimization of engineered biosynthetic pathways of high value bioactive natural products.

Acknowledgments

This work was supported by the VILLUM research center for Plant Plasticity and by the Center for Synthetic Biology: bioSYnergy, supported by the UCPH Excellence Program for Interdisciplinary Research.

References

- Barkai, N. and Leibler, S. (1997) Robustness in simple biochemical networks. *Nature* 387, 913–917
- Hartwell, L.H. *et al.* (1999) From molecular to modular cell biology. *Nature* 402, C47–C52
- Jeong, H. *et al.* (2000) The large-scale organization of metabolic networks. *Nature* 407, 651–654
- Jorgensen, K. *et al.* (2005) Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 280–291
- Bolwell, G.P. *et al.* (1994) Plant cytochrome P450. *Phytochemistry* 37, 1491–1506
- Hamberger, B. and Bak, S. (2013) Plant P450s as versatile drivers for evolution of species-specific chemical diversity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 368, 20120426
- Hannemann, F. *et al.* (2007) Cytochrome P450 systems – biological variations of electron transport chains. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 330–344
- Werck-Reichhart, D. and Feyereisen, R. (2000) Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* 1, REVIEWS 3003.1–3003.9
- Keasling, J.D. *et al.* (2012) Synthesis: a constructive debate. *Nature* 492, 188–189
- Vermilion, J.L. *et al.* (1981) Separate roles for FMN and FAD in catalysis by liver microsomal NADPH–cytochrome P-450 reductase. *J. Biol. Chem.* 256, 266–277
- Ralston, L. and Yu, O. (2006) Metabolons involving plant cytochrome P450s. *Phytochem. Rev.* 5, 459–472
- Reed, L.J. (1974) Multienzyme complexes. *Accounts Chem. Res.* 7, 40–46
- Srere, P.A. (1985) The metabolon. *Trends Biochem. Sci.* 10, 109–110
- Srere, P.A. (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 89–124
- Winkel, B.S. (2004) Metabolic channeling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 85–107
- Wilson, J.E. (1978) Ambiquitous enzymes – variation in intracellular-distribution as a regulatory mechanism. *Trends Biochem. Sci.* 3, 124–125
- Nooren, I.M.A. and Thornton, J.M. (2003) Diversity of protein–protein interactions. *EMBO J.* 22, 3486–3492
- Perkins, J.R. *et al.* (2010) Transient protein–protein interactions: structural, functional, and network properties. *Structure* 18, 1233–1243
- Møller, B.L. (2010) Dynamic metabolons. *Science* 330, 1328–1329
- Thellier, M. *et al.* (2006) Steady-state kinetic behaviour of functioning-dependent structures. *FEBS J.* 273, 4287–4299
- Thellier, M. *et al.* (2004) Introduction to the concept of functioning-dependent structures in living cells. *C. R. Biol.* 327, 1017–1024
- Graciet, E. *et al.* (2003) The small protein CP12: a protein linker for supramolecular complex assembly. *Biochemistry* 42, 8163–8170
- Lebreton, S. *et al.* (2006) Mapping of the interaction site of CP12 with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Functional consequences for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *FEBS J.* 273, 3358–3369
- Nussinov, R. *et al.* (2013) A broad view of scaffolding suggests that scaffolding proteins can actively control regulation and signaling of multienzyme complexes through allostery. *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 820–829
- Feng, W. and Zhang, M. (2009) Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 87–99
- Songyang, Z. *et al.* (1997) Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275, 73–77
- Zhang, M. and Wang, W. (2003) Organization of signaling complexes by PDZ-domain scaffold proteins. *Acc. Chem. Res.* 36, 530–538
- Gardiner, J. *et al.* (2011) PDZ domain proteins: ‘dark matter’ of the plant proteome? *Mol. Plant* 4, 933–937
- Yamamoto, Y. *et al.* (2008) Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. *Photosynth. Res.* 98, 589–608
- Sun, R. *et al.* (2012) Crystal structure of *Arabidopsis* Deg2 protein reveals an internal PDZ ligand locking the hexameric resting state. *J. Biol. Chem.* 287, 37564–37569
- Rakus, D. *et al.* (2004) Interaction between muscle aldolase and muscle fructose 1,6-bisphosphatase results in the substrate channeling. *Biochemistry* 43, 14948–14957
- You, C. and Zhang, Y.H. (2013) Self-assembly of synthetic metabolons through synthetic protein scaffolds: one-step purification, co-immobilization, and substrate channeling. *ACS Synth. Biol.* 2, 102–110
- Hilser, V.J. and Thompson, E.B. (2007) Intrinsic disorder as a mechanism to optimize allosteric coupling in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 8311–8315

- 34 Leitner, D.M. (2008) Energy flow in proteins. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 59, 233–259
- 35 Henzler-Wildman, K.A. *et al.* (2007) A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis. *Nature* 450, 913–U927
- 36 Hatzakis, N.S. *et al.* (2012) Single enzyme studies reveal the existence of discrete functional states for monomeric enzymes and how they are 'selected' upon allosteric regulation. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 9296–9302
- 37 Laursen, T. *et al.* (2014) Single molecule activity measurements of cytochrome p450 oxidoreductase reveal the existence of two discrete functional States. *ACS Chem. Biol.* 9, 630–634
- 38 Goodey, N.M. and Benkovic, S.J. (2008) Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route. *Nat. Chem. Biol.* 4, 474–482
- 39 Jensen, K. and Möller, B.L. (2010) Plant NADPH–cytochrome P450 oxidoreductases. *Phytochemistry* 71, 132–141
- 40 Scott, E.E. *et al.* (2003) An open conformation of mammalian cytochrome P450 2B4 at 1.6-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13196–13201
- 41 Aguiar, M. *et al.* (2005) Regulation of cytochrome P450 by posttranslational modification. *Drug Metab. Rev.* 37, 379–404
- 42 Oesch-Bartlomowicz, B. and Oesch, F. (2003) Cytochrome-P450 phosphorylation as a functional switch. *Arch. Biochem. Biophys.* 409, 228–234
- 43 Bartlomowicz, B. *et al.* (1989) Regio- and stereoselective regulation of monooxygenase activities by isoenzyme-selective phosphorylation of cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 46–52
- 44 Wang, M. *et al.* (1997) Three-dimensional structure of NADPH–cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 8411–8416
- 45 Laursen, T. *et al.* (2011) Conformational changes of the NADPH-dependent cytochrome P450 reductase in the course of electron transfer to cytochromes P450. *Biochim. Biophys. Acta* 1814, 132–138
- 46 Hay, S. *et al.* (2010) Nature of the energy landscape for gated electron transfer in a dynamic redox protein. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 9738–9745
- 47 Wadsater, M. *et al.* (2012) Monitoring shifts in the conformation equilibrium of the membrane protein cytochrome P450 reductase (POR) in nanodiscs. *J. Biol. Chem.* 287, 34596–34603
- 48 Ellis, J. *et al.* (2009) Domain motion in cytochrome P450 reductase: conformational equilibria revealed by NMR and small-angle x-ray scattering. *J. Biol. Chem.* 284, 36628–36637
- 49 Pudney, C.R. *et al.* (2011) Coupled motions direct electrons along human microsomal P450 Chains. *PLoS Biol.* 9, e1001222
- 50 Lamb, D.C. *et al.* (2001) Activities and kinetic mechanisms of native and soluble NADPH–cytochrome P450 reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 48–54
- 51 Fluck, C.E. *et al.* (2004) Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley–Bixler syndrome. *Nat. Genet.* 36, 228–230
- 52 Huang, N. *et al.* (2005) Diversity and function of mutations in p450 oxidoreductase in patients with Antley–Bixler syndrome and disordered steroidogenesis. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 729–749
- 53 Xia, C. *et al.* (2011) Structural basis for human NADPH–cytochrome P450 oxidoreductase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 13486–13491
- 54 Huang, N. *et al.* (2008) Genetics of P450 oxidoreductase: sequence variation in 842 individuals of four ethnicities and activities of 15 missense mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1733–1738
- 55 Miller, W.L. *et al.* (2011) Consequences of POR mutations and polymorphisms. *Mol. Cell. Endocrinol.* 336, 174–179
- 56 Pandey, A.V. and Fluck, C.E. (2013) NADPH P450 oxidoreductase: structure, function, and pathology of diseases. *Pharmacol. Ther.* 138, 229–254
- 57 Pandey, A.V. *et al.* (2007) Modulation of human CYP19A1 activity by mutant NADPH P450 oxidoreductase. *Mol. Endocrinol.* 21, 2579–2595
- 58 Nadler, S.G. and Strobel, H.W. (1988) Role of electrostatic interactions in the reaction of NADPH–cytochrome P-450 reductase with cytochromes P-450. *Arch. Biochem. Biophys.* 261, 418–429
- 59 Tamburini, P.P. and Schenkman, J.B. (1986) Differences in the mechanism of functional interaction between NADPH–cytochrome P-450 reductase and its redox partners. *Mol. Pharmacol.* 30, 178–185
- 60 Porter, T.D. (2002) The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16, 311–316
- 61 Bonfils, C. *et al.* (1981) Direct evidence for electron transfer from ferrous cytochrome b5 to the oxyferrous intermediate of liver microsomal cytochrome P-450 LM2. *J. Biol. Chem.* 256, 9457–9465
- 62 Morgan, E.T. and Coon, M.J. (1984) Effects of cytochrome b5 on cytochrome P-450-catalyzed reactions. Studies with manganese-substituted cytochrome b5. *Drug Metab. Dispos.* 12, 358–364
- 63 Guzov, V.M. *et al.* (1996) Molecular cloning, overexpression in *Escherichia coli*, structural and functional characterization of house fly cytochrome b5. *J. Biol. Chem.* 271, 26637–26645
- 64 Auchus, R.J. *et al.* (1998) Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. *J. Biol. Chem.* 273, 3158–3165
- 65 Ekroos, M. and Sjogren, T. (2006) Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 13682–13687
- 66 Bayburt, T.H. *et al.* (2002) Self-assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane scaffold proteins. *Nano Lett.* 2, 853–856
- 67 Denisov, I.G. *et al.* (2004) Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer nanodiscs with controlled size. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 3477–3487
- 68 Sligar, S.G. (2003) Finding a single-molecule solution for membrane proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 115–119
- 69 Baas, B.J. *et al.* (2004) Homotropic cooperativity of monomeric cytochrome P450 3A4 in a nanoscale native bilayer environment. *Arch. Biochem. Biophys.* 430, 218–228
- 70 Denisov, I.G. *et al.* (2007) Cooperativity in cytochrome P450 3A4: linkages in substrate binding, spin state, uncoupling, and product formation. *J. Biol. Chem.* 282, 7066–7076
- 71 Isin, E.M. and Guengerich, F.P. (2006) Kinetics and thermodynamics of ligand binding by cytochrome P450 3A4. *J. Biol. Chem.* 281, 9127–9136
- 72 Wester, M.R. *et al.* (2004) The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0-Å resolution. *J. Biol. Chem.* 279, 35630–35637
- 73 Williams, P.A. *et al.* (2003) Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* 424, 464–468
- 74 Zhao, Y. and Halpert, J.R. (2007) Structure-function analysis of cytochromes P450 2B. *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 402–412
- 75 Davydov, D.R. and Halpert, J.R. (2008) Allosteric P450 mechanisms: multiple binding sites, multiple conformers or both? *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4, 1523–1535
- 76 Reed, J.R. *et al.* (2011) Inhibition of cytochrome P450 1A2-mediated metabolism and production of reactive oxygen species by heme oxygenase-1 in rat liver microsomes. *Drug Metab. Lett.* 5, 6–16
- 77 Estabrook, R.W. *et al.* (1971) Biochemical and genetic factors influencing drug metabolism. Influence of hepatic microsomal mixed function oxidation reactions on cellular metabolic control. *Metabolism* 20, 187–199
- 78 Reed, J.R. and Backes, W.L. (2012) Formation of P450. P450 complexes and their effect on P450 function. *Pharmacol. Ther.* 133, 299–310
- 79 Reed, J.R. *et al.* (2010) Functional interactions between cytochromes P450 1A2 and 2B4 require both enzymes to reside in the same phospholipid vesicle: evidence for physical complex formation. *J. Biol. Chem.* 285, 8942–8952
- 80 Davydov, D.R. *et al.* (2010) Electron transfer in the complex of membrane-bound human cytochrome P450 3A4 with the flavin domain of P450BM-3: the effect of oligomerization of the heme protein and intermittent modulation of the spin equilibrium. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 378–390
- 81 Davydov, D.R. *et al.* (2005) Kinetics of dithionite-dependent reduction of cytochrome P450 3A4: heterogeneity of the enzyme caused by its oligomerization. *Biochemistry* 44, 13902–13913
- 82 Hrazdina, G. and Jensen, R.A. (1992) Spatial organization of enzymes in plant metabolic pathways. *Annu. Rev. Plant Phys.* 43, 241–267
- 83 Zerbe, P. *et al.* (2013) Gene discovery of modular diterpene metabolism in nonmodel systems. *Plant Physiol.* 162, 1073–1091
- 84 Wijekoon, C.P. and Facchini, P.J. (2012) Systematic knockdown of morphine pathway enzymes in opium poppy using virus-induced gene silencing. *Plant J.* 69, 1052–1063

- 85 Gesell, A. *et al.* (2009) CYP719B1 is salutaridine synthase, the C–C phenol-coupling enzyme of morphine biosynthesis in opium poppy. *J. Biol. Chem.* 284, 24432–24442
- 86 Mehrshahi, P. *et al.* (2013) Transorganellar complementation redefines the biochemical continuity of endoplasmic reticulum and chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 12126–12131
- 87 Nielsen, A.Z. *et al.* (2013) Redirecting photosynthetic reducing power toward bioactive natural product synthesis. *ACS Synth. Biol.* 2, 308–315
- 88 Lassen, L.M. *et al.* (2014) Redirecting photosynthetic electron flow into light-driven synthesis of alternative products including high-value bioactive natural compounds. *ACS Synth. Biol.* 3, 1–12
- 89 Jensen, K. *et al.* (2011) Light-driven cytochrome p450 hydroxylations. *ACS Chem. Biol.* 6, 533–539
- 90 Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572
- 91 Brignac-Huber, L.M. *et al.* (2013) Relationship between CYP1A2 localization and lipid microdomain formation as a function of lipid composition. *Drug Metab. Dispos.* 41, 1896–1905
- 92 Das, A. and Sligar, S.G. (2009) Modulation of the cytochrome P450 reductase redox potential by the phospholipid bilayer. *Biochemistry* 48, 12104–12112
- 93 Ingelman-Sundberg, M. *et al.* (1981) Membrane charge as effector of cytochrome P-450LM2 catalyzed reactions in reconstituted liposomes. *Biochemistry* 20, 4100–4106
- 94 Choi, Y.H. *et al.* (2011) Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol.* 156, 1701–1705
- 95 Abbott, A.P. *et al.* (2004) Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 9142–9147
- 96 Dai, Y. *et al.* (2013) Ionic liquids and deep eutectic solvents in natural products research: mixtures of solids as extraction solvents. *J. Nat. Prod.* 76, 2162–2173
- 97 Dai, Y. *et al.* (2013) Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta* 766, 61–68
- 98 Dai, Y. *et al.* (2013) Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Anal. Chem.* 85, 6272–6278
- 99 Mustafa, N.R. *et al.* (2011) Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nat. Protoc.* 6, 715–742
- 100 Martin, C. *et al.* (1991) Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J.* 1, 37–49
- 101 Markham, K.R. *et al.* (2000) Anthocyanic vacuolar inclusions – their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry* 55, 327–336
- 102 Gorke, J. *et al.* (2010) Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 15, 40–53
- 103 Zhao, H. *et al.* (2011) New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel. *Org. Biomol. Chem.* 9, 1908–1916
- 104 Vogt, T. (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant* 3, 2–20
- 105 Busk, P.K. and Møller, B.L. (2002) Dhurrin synthesis in sorghum is regulated at the transcriptional level and induced by nitrogen fertilization in older plants. *Plant Physiol.* 129, 1222–1231
- 106 Stafford, H.A. (1974) Possible multienzyme complexes regulating the formation of C6–C3 phenolic compounds and lignins in higher plants. *Rec. Adv. Phytochem.* 8, 53–79
- 107 Czichi, U. and Kindi, H. (1975) A model of closely assembled consecutive enzymes on membranes: formation of hydroxycinnamic acids from L-phenylalanine on thylakoids of *Dunaliella marina*. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 356, 475–485
- 108 Czichi, U. and Lennarz, W.J. (1977) Localization of the enzyme system for glycosylation of proteins via the lipid-linked pathway in rough endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 252, 7901–7904
- 109 Achnine, L. *et al.* (2004) Colocalization of L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase for metabolic channeling in phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 16, 3098–3109
- 110 Owens, D.K. *et al.* (2008) Functional analysis of a predicted flavonol synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 147, 1046–1061
- 111 Stracke, R. *et al.* (2009) Metabolomic and genetic analyses of flavonol synthesis in *Arabidopsis thaliana* support the *in vivo* involvement of leucoanthocyanidin dioxygenase. *Planta* 229, 427–445
- 112 Turnbull, J.J. *et al.* (2000) Are anthocyanidins the immediate products of anthocyanidin synthase? *Chem. Commun.* 2000, 2473–2474
- 113 Crosby, K.C. *et al.* (2011) Forster resonance energy transfer demonstrates a flavonoid metabolon in living plant cells that displays competitive interactions between enzymes. *FEBS Lett.* 585, 2193–2198
- 114 Liu, C.J. and Dixon, R.A. (2001) Elicitor-induced association of isoflavone O-methyltransferase with endomembranes prevents the formation and 7-O-methylation of daidzein during isoflavonoid phytoalexin biosynthesis. *Plant Cell* 13, 2643–2658
- 115 Bassard, J.E. *et al.* (2012) Protein–protein and protein–membrane associations in the lignin pathway. *Plant Cell* 24, 4465–4482
- 116 Chen, H.C. *et al.* (2011) Membrane protein complexes catalyze both 4- and 3-hydroxylation of cinnamic acid derivatives in monolignol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 21253–21258
- 117 Chen, H.C. *et al.* (2014) Systems biology of lignin biosynthesis in *Populus trichocarpa*: heteromeric 4-coumaric acid: coenzyme A ligase protein complex formation, regulation, and numerical modeling. *Plant Cell* 26, 876–893
- 118 Wang, J.P. *et al.* (2014) Complete proteomic-based enzyme reaction and inhibition kinetics reveal how monolignol biosynthetic enzyme families affect metabolic flux and lignin in *Populus trichocarpa*. *Plant Cell* 26, 894–914
- 119 Ro, D.K. and Douglas, C.J. (2004) Reconstitution of the entry point of plant phenylpropanoid metabolism in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) – Implications for control of metabolic flux into the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 2600–2607
- 120 Lee, Y. *et al.* (2012) Functional analysis of metabolic channeling and regulation in lignin biosynthesis: a computational approach. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002769
- 121 Vanholme, R. *et al.* (2013) Caffeoyl shikimate esterase (CSE) is an enzyme in the lignin biosynthetic pathway in *Arabidopsis*. *Science* 341, 1103–1106
- 122 Abdulrazzak, N. *et al.* (2006) A coumaroyl-ester-3-hydroxylase insertion mutant reveals the existence of nonredundant meta-hydroxylation pathways and essential roles for phenolic precursors in cell expansion and plant growth. *Plant Physiol.* 140, 30–48
- 123 Bonawitz, N.D. *et al.* (2014) Disruption of mediator rescues the stunted growth of a lignin-deficient *Arabidopsis* mutant. *Nature* 509, 376–380
- 124 Hoffmann, L. *et al.* (2004) Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quininate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell* 16, 1446–1465
- 125 Schillmiller, A.L. *et al.* (2009) Mutations in the cinnamate 4-hydroxylase gene impact metabolism, growth and development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 60, 771–782
- 126 Zhang, X. *et al.* (2013) *Arabidopsis* Kelch repeat F-box proteins regulate phenylpropanoid biosynthesis via controlling the turnover of phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Cell* 25, 4994–5010
- 127 Zhang, L. *et al.* (2014) BrMYB4, a suppressor of genes for phenylpropanoid and anthocyanin biosynthesis, is downregulated by UV-B but not by pigment-inducing sunlight in turnip cv. Tsuda. *Plant Cell Physiol.* <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pcu137>
- 128 Mitsunami, T. *et al.* (2014) Overexpression of the PAP1 transcription factor reveals a complex regulation of flavonoid and phenylpropanoid metabolism in *Nicotiana tabacum* plants attacked by *Spodoptera litura*. *PLoS ONE* 9, e108849
- 129 Degu, A. *et al.* (2014) Metabolite and transcript profiling of berry skin during fruit development elucidates differential regulation between Cabernet Sauvignon and Shiraz cultivars at branching points in the polyphenol pathway. *BMC Plant Biol.* 14, 188
- 130 Ali, M.B. and McNear, D.H., Jr (2014) Induced transcriptional profiling of phenylpropanoid pathway genes increased flavonoid and lignin content in *Arabidopsis* leaves in response to microbial products. *BMC Plant Biol.* 14, 84
- 131 Møller, B.L. (2010) Functional diversifications of cyanogenic glucosides. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 338–347
- 132 Gleadow, R.M. and Møller, B.L. (2014) Cyanogenic glycosides: synthesis, physiology, and phenotypic plasticity. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 155–185
- 133 Dunstan, W.R. and Henry, T.A. (1902) ‘Cyanogenesis in plants. Part II. The Great Millet, *Sorghum vulgare*.’. *Proc. R. Soc. Lond.* 70, 153–154

- 134 Halkier, B.A. and Møller, B.L. (1989) Biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in seedlings of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and partial purification of the enzyme system involved. *Plant Physiol.* 90, 1552–1559
- 135 Bak, S. *et al.* (1998) Cloning of three A-type cytochromes p450, CYP71E1, CYP98, and CYP99 from *Sorghum bicolor* (L.) Moench by a PCR approach and identification by expression in *Escherichia coli* of CYP71E1 as a multifunctional cytochrome p450 in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin. *Plant Mol. Biol.* 36, 393–405
- 136 Halkier, B.A. *et al.* (1995) Purification and characterization of recombinant cytochrome P450TYR expressed at high levels in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 322, 369–377
- 137 Kahn, R.A. *et al.* (1997) Isolation and reconstitution of cytochrome P450ox and *in vitro* reconstitution of the entire biosynthetic pathway of the cyanogenic glucoside dhurrin from sorghum. *Plant Physiol.* 115, 1661–1670
- 138 Koch, B.M. *et al.* (1995) The primary sequence of cytochrome P450tyr, the multifunctional N-hydroxylase catalyzing the conversion of L-tyrosine to *p*-hydroxyphenylacetaldehyde oxime in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Arch. Biochem. Biophys.* 323, 177–186
- 139 Sibbesen, O. *et al.* (1994) Isolation of the heme-thiolate enzyme cytochrome P-450TYR, which catalyzes the committed step in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 9740–9744
- 140 Sibbesen, O. *et al.* (1995) Cytochrome P-450TYR is a multifunctional heme-thiolate enzyme catalyzing the conversion of L-tyrosine to *p*-hydroxyphenylacetaldehyde oxime in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J. Biol. Chem.* 270, 3506–3511
- 141 Halkier, B.A. and Møller, B.L. (1991) Involvement of cytochrome P-450 in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Physiol.* 96, 10–17
- 142 Jones, P.R. *et al.* (1999) The UDP-glucose:*p*-hydroxymandelonitrile-O-glucosyltransferase that catalyzes the last step in synthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor*. Isolation, cloning, heterologous expression, and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 274, 35483–35491
- 143 Hansen, K.S. *et al.* (2003) The *in vitro* substrate regiospecificity of recombinant UGT85B1, the cyanohydrin glucosyltransferase from *Sorghum bicolor*. *Phytochemistry* 64, 143–151
- 144 Takos, A.M. *et al.* (2011) Genomic clustering of cyanogenic glucoside biosynthetic genes aids their identification in *Lotus japonicus* and suggests the repeated evolution of this chemical defence pathway. *Plant J.* 68, 273–286
- 145 Nielsen, J.S. and Møller, B.L. (1999) Biosynthesis of cyanogenic glucosides in *Triglochin maritima* and the involvement of cytochrome P450 enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 368, 121–130
- 146 Kannangara, R. *et al.* (2011) Characterization and expression profile of two UDP-glucosyltransferases, UGT85K4 and UGT85K5, catalyzing the last step in cyanogenic glucoside biosynthesis in cassava. *Plant J.* 68, 287–301
- 147 Halkier, B.A. and Møller, B.L. (1990) The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. Identification of three hydroxylation steps in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench and the involvement of 1-ACI-nitro-2-(*p*-hydroxyphenyl)ethane as an intermediate. *J. Biol. Chem.* 265, 21114–21121
- 148 Møller, B.L. and Conn, E.E. (1979) The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. *N*-Hydroxytyrosine as an intermediate in the biosynthesis of dhurrin by *Sorghum bicolor* (Linn) Moench. *J. Biol. Chem.* 254, 8575–8583
- 149 Shimada, M. and Conn, E.E. (1977) The enzymatic conversion of *p*-hydroxyphenylacetaldehyde oxime to *p*-hydroxymandelonitrile. *Arch. Biochem. Biophys.* 180, 199–207
- 150 Møller, B.L. and Conn, E.E. (1980) The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. Channeling of intermediates in dhurrin biosynthesis by a microsomal system from *Sorghum bicolor* (Linn) Moench. *J. Biol. Chem.* 255, 3049–3056
- 151 Halkier, B.A. *et al.* (1989) The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. The (E)- and (Z)-isomers of *p*-hydroxyphenylacetaldehyde oxime as intermediates in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J. Biol. Chem.* 264, 19487–19494
- 152 Nielsen, K.A. *et al.* (2008) Metabolon formation in dhurrin biosynthesis. *Phytochemistry* 69, 88–98
- 153 Hansen, C.H. *et al.* (2001) Cytochrome p450 CYP79F1 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of dihomomethionine and trihomomethionine to the corresponding aldoximes in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates. *J. Biol. Chem.* 276, 11078–11085
- 154 Mikkelsen, M.D. *et al.* (2000) Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J. Biol. Chem.* 275, 33712–33717
- 155 Wittstock, U. and Halkier, B.A. (2000) Cytochrome P450 CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of benzylglucosinolate. *J. Biol. Chem.* 275, 14659–14666
- 156 Bak, S. *et al.* (2006) Cyanogenic glycosides: a case study for evolution and application of cytochromes P450. *Phytochem. Rev.* 5, 309–329
- 157 Bak, S. *et al.* (1999) Metabolic engineering of *p*-hydroxybenzylglucosinolate in *Arabidopsis* by expression of the cyanogenic CYP79A1 from *Sorghum bicolor*. *Plant J.* 20, 663–671
- 158 Kristensen, C. *et al.* (2005) Metabolic engineering of dhurrin in transgenic *Arabidopsis* plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1779–1784
- 159 Tattersall, D.B. *et al.* (2001) Resistance to an herbivore through engineered cyanogenic glucoside synthesis. *Science* 293, 1826–1828
- 160 Naur, P. *et al.* (2003) CYP83A1 and CYP83B1, two nonredundant cytochrome P450 enzymes metabolizing oximes in the biosynthesis of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133, 63–72
- 161 Glawischnig, E. *et al.* (2004) Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8245–8250
- 162 Bednarek, P. and Osbourn, A. (2009) Plant–microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* 324, 746–748
- 163 Bednarek, P. *et al.* (2009) A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science* 323, 101–106
- 164 Clay, N.K. *et al.* (2009) Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science* 323, 95–101
- 165 Morant, A.V. *et al.* (2008) The beta-glucosidases responsible for bioactivation of hydroxynitrile glucosides in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 147, 1072–1091
- 166 Zhao, H. *et al.* (2013) The purinosome, a multi-protein complex involved in the *de novo* biosynthesis of purines in humans. *Chem. Commun.* 49, 4444–4452
- 167 Wishart, D.S. *et al.* (2006) DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 34, D668–D672
- 168 Patterson, D. *et al.* (1999) Human phosphoribosylformylglycineamide amidotransferase (FGARAT): regional mapping, complete coding sequence, isolation of a functional genomic clone, and DNA sequence analysis. *Gene* 239, 381–391
- 169 Deng, Y.J. *et al.* (2012) Mapping protein–protein proximity in the purinosome. *J. Biol. Chem.* 287, 36201–36207
- 170 An, S.G. *et al.* (2008) Reversible compartmentalization of *de novo* purine biosynthetic complexes in living cells. *Science* 320, 103–106
- 171 Szabados, E. and Christopherson, R.I. (1998) Relationship between the catalytic sites of human bifunctional IMP synthase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 933–942
- 172 Bulock, K.G. *et al.* (2002) The kinetic mechanism of the human bifunctional enzyme ATIC (5-amino-4-imidazolecarboxamide ribonucleotide transformylase/inosine 5′-monophosphate cyclohydrolase). A surprising lack of substrate channeling. *J. Biol. Chem.* 277, 22168–22174
- 173 Rudolph, J. and Stubbe, J. (1995) Investigation of the mechanism of phosphoribosylamine transfer from glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase to glycylamide ribonucleotide synthetase. *Biochemistry* 34, 2241–2250
- 174 French, J.B. *et al.* (2013) Hsp70/Hsp90 chaperone machinery is involved in the assembly of the purinosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 2528–2533
- 175 Makhnevych, T. and Houry, W.A. (2012) The role of Hsp90 in protein complex assembly. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 674–682

- 176 Young, J.C. *et al.* (2003) More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem. Sci.* 28, 541–547
- 177 An, S. *et al.* (2010) Microtubule-assisted mechanism for functional metabolic macromolecular complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 12872–12876
- 178 Verrier, F. *et al.* (2011) GPCRs regulate the assembly of a multienzyme complex for purine biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* 7, 909–915
- 179 An, S. *et al.* (2010) Dynamic regulation of a metabolic multi-enzyme complex by protein kinase CK2. *J. Biol. Chem.* 285, 11093–11099
- 180 Allwood, E.G. *et al.* (1999) Phosphorylation of phenylalanine ammonia-lyase: evidence for a novel protein kinase and identification of the phosphorylated residue. *FEBS Lett.* 457, 47–52
- 181 Knowles, T.J. *et al.* (2009) Membrane proteins solubilized intact in lipid containing nanoparticles bounded by styrene maleic acid copolymer. *J. Am. Chem. Soc.* 131, 7484–7485
- 182 Jamshad, M. *et al.* (2011) Surfactant-free purification of membrane proteins with intact native membrane environment. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 813–818
- 183 Long, A.R. *et al.* (2013) A detergent-free strategy for the reconstitution of active enzyme complexes from native biological membranes into nanoscale discs. *BMC Biotechnol.* 13, 41
- 184 Kynde, S.A. *et al.* (2014) Small-angle scattering gives direct structural information about a membrane protein inside a lipid environment. *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.* 70, 371–383
- 185 Hopper, J.T. *et al.* (2013) Detergent-free mass spectrometry of membrane protein complexes. *Nat. Methods* 10, 1206–1208
- 186 Laganowsky, A. *et al.* (2014) Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function. *Nature* 510, 172–175
- 187 Lallemand, B. *et al.* (2013) Sporopollenin biosynthetic enzymes interact and constitute a metabolon localized to the endoplasmic reticulum of tapetum cells. *Plant Physiol.* 162, 616–625