

Analyse fonctionnelle de gènes impliqués dans le développement du pollen chez *Arabidopsis thaliana*

Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur de l'Université de Strasbourg Discipline : Sciences du Vivant, Aspect Moléculaire et Cellulaire de la Biologie

par

Etienne Grienenberger

Soutenue publiquement le 21 janvier 2010 devant la Commission d'Examen :

Pr Léon Otten Pr Benoît Saint-Pierre Dr Herman Höfte Dr Michel Legrand Rapporteur interne Rapporteur externe Rapporteur externe Directeur de thèse

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP-CNRS, Strasbourg)

Merci à Michel pour son dévouement dans mon encadrement, pour ses précieux conseils et pour m'avoir transmis la passion de la recherche.

Merci à Pierrette pour son travail exceptionnel, mais surtout pour ses grandes qualités humaines et pour sa sympathie.

Merci à Thierry pour avoir essuyé les plâtres de ma formation à la recherche, pour son humour distillé et pour son implication dans ce travail.

Merci à Benjamin pour sa participation motivée à ce travail.

Merci aux membres de mon jury de thèse, Léon Otten, Herman Höfte et Benoît St-Pierre, pour leur implication dans l'évaluation de ce travail.

Merci à ma famille pour son soutien tout au long de mes études.

Merci à Pascaline et à Denise, pour leur aide et pour leur sympathie.

Merci aux personnes rencontrées au cours de la thèse, qui m'ont fait profiter de leur travail, de leur expérience et de leur sympathie.

« J'ai dit Banco ! je m'en ferai un chapeau »

> Christian Olivier « Banco »

Sommaire

Introduction générale

I – Préambule : le métabolisme secondaire des plantes et l'évolution	1
1 ^e Partie. Le métabolisme des phénylpropanoïdes	5
 I – La voie générale des phénylpropanoïdes. 1/ La Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL) 2/ La Cinnamate 4-Hydroxylase 3/ La Coumarate 4-Ligase (4CL) 4/ Produits dérivés de la voie générale des phénylpropanoïdes et régulations 	5 6 7 8 9
 II – La voie des monolignoles L'hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate hydroxycinnamoyltransférase (HCT) La coumarate 3-Hydroxylase (C3H / CYP98A3) Produits et fonctions dérivant de la voie des monolignoles	10 11 12 13 13 15 15
 III – La voie des flavonoïdes I/ Introduction Fonctions associées aux flavonoïdes Coloration des tissus/attraction des pollinisateurs Défense induite contre les pathogènes : les phytoalexines Protection contre les UVs Rôle dans la fertilité mâle Régulation du transport de l'auxine 	 16 18 18 19 19 20
 IV – Autres voies dérivant de la voie générale ou des voies secondaires : nature et fonction produits Les stilbènes Les coumarines Les polyesters lipidiques : cutine et subérine La sporopollénine Les amides d'acides hydroxycinnamiques (phénolamides) a/ Les hydroxycinnamoyl amides dans la défense Les Tyramine Hydroxycinnamoyl Transferase (THT) et la feruloyl tyramine L' Agmatine Coumaroyl Transférase (ACT) et les hydroxycinnamoyl agmatines Les hydroxycinnamoyl agmatines Les hydroxycinnamoyl agmatines 	des 21 21 22 22 23 23 23 24 25 26 26 26
2 ^e Partie - Les acyltransférases du type BAHD	20 27 29
I – Acylation enzymatique : définition et caractéristiques	29
II – La superfamille des BAHD 1/ Introduction 2/ Caractéristiques structurales des BAHD	29 30 31

 3/ Répartition des BAHD chez les plantes et analyse phylogénétique 4/ Les BAHD chez Arabidopsis a/ Caractérisation de BAHD chez Arabidopsis b/ Arabido ségététique a définition de neuroseux ele des et 	31 33 33
complexification du modèle	34
3 ^e Partie. Métabolismes associés au développement du pollen	36
I – Développement de l'anthère et du pollen	36
1/ Développement de l'anthère	36
2/ Développement du pollen	37
II – Métabolismes spécifiques du pollen	38
1/ Biosynthèse de la paroi du pollen	38
a/ Influence de l'environnement sporophytique dans la biosynthèse de la paroi	
pollinique : participation du tapétum.	38
b/ Cinétique de formation de la paroi pollinique	39
c/ Constitution chimique et distribution de l'exine	40
d/ Constitution chimique et fonctions du manteau pollinique	41
2/ Biosynthèse de la paroi du pollen : approches génomiques	42
a/ Caractérisation de gènes catalytiques impliqués dans la synthèse de l'exine	42
b/ Gène impliqué dans la synthèse du manteau pollinique	44
c/ Caractérisation de gènes régulateurs impliqués dans la synthèse de l'exine	44
3/ Modèles biochimiques, métaboliques et de régulation pour la synthèse de	
l'exine et du manteau pollinique	45
a/ Constitution et structure de la sporopollénine : un modèle proposé.	45

Chapitre 1. Caractérisation et analyse fonctionnelle de la Sper Hydroxycinnamoyl Transférase (SHT) d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	midine
I – Introduction	47
1/ Contexte de l'étude	47
2/ Recherche et analyse phylogénétique des BAHD d'Arabidopsis :	
sélection d' « HCT-like »	47
II – Fonction de <i>At5g57840</i> : une acyltransférase proche d'HCT chez <i>Arabidopsis</i> .	48
1/ Détermination du patron d'expression de HCT-like1	48
a/ Analyse <i>in silico</i>	48
b/ Analyse de la fusion <i>pAt5g57840 :: GUS</i>	48
2/ Caractérisation de lignées mutantes pour <i>HCT-like1</i>	49
3/ Obtention de la protéine recombinante et tests d'activité	50
III – Caractérisation de la Spermidine Hydroxycinnamoyl Transférase (SHT) article :	51
Grienenberger E, Besseau S, Geoffroy P, Debayle D, Heintz D, Lapierre C, Pollet B,	
Heitz T, and Legrand M. A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of	
Arabidopsis anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines.	
Plant Journal (2009) 58(2):246-59.	51
IV – Analyse fonctionnelle de <i>SHT</i> : complément à l'article	68
1/ SHT et la viabilité du pollen	68
2/ Rôle de SHT dans la germination du pollen	68
3/ Rôle des hydroxycinnamoyl spermidines dans la protection contre les UV-B	69
4/ Rôle de SHT dans la structure de la paroi du pollen	70
5/ Role des hydroxycinnamoyi spermidines dans la fertilite male	/0 71
6/ Etude de l'expression constitutive de SH1	/1
Chapitre 1. Discussion et Perspectives	72
I – At5g57840 (HCT-like1)	72
II – Spermidine Hydroxycinnamoyl Transférases (SHT)	73
1/ Conservation et distribution des Spermidine Hydroxycinnamoyl Transférases	73
2/ Voie des phénolamides du pollen et plasticité métabolique	74
3/ Voie des phénolamides du pollen et « channeling » métabolique	74
4/ De la fonction des phénolamides du pollen	75
Chapitre 2. Caractérisation de nouveaux acteurs de biosynthèse de la sporopolléni	ne

I – Introduction : sélection de gènes exprimés dans les bourgeons floraux	78
II – Résultats : caractérisation de gènes impliqués dans la biosynthèse de l'exine 1/ Patron d'expression de $4t l g02050$, $4t 4g34850$, $4t 4g35420$ et	79
At1g68540 dans la plante et durant le développement floral	79
2/ Sélection et analyse de mutants d'insertion	80
3/ Les mutants d'insertion présentent des défauts de l'exine	81

86

4/ Le double mutant pks-a/pks-b est mâle stérile	82
5/ Le pollen des mutants <i>pks-a</i> , <i>pks-b</i> et <i>tpr2</i> est viable	82
6/ Activités enzymatiques des protéines PKS (At1g02050 et	
At4g34850) et TPR (At4g35420 et At1g68540)	83
7/ Analyse phylogénétique des PKS et TPR	84

Chapitre 2. Discussion et Perspectives

Chapitre 3. Recherche de fonctions de transférases BAHD par une approche génomique et métabolique

I – Introduction	91
II – Résultats : Analyse de BAHD d' <i>Arabidopsis</i> exprimées dans les graines et les bourgeons floraux	91
1/ Quelques pistes pour la recherche de fonction	91
2/ Sélection de BAHD par un crible de l'expression spatiale des gènes	92
3/ Analyse des gènes BAHD spécifiquement exprimés dans les graines	93
a/ La graine d'Arabidopsis accumule des conjugués disinapoyl-spermidines	93
b/ Le mutant de At2g23510 n'accumule plus les conjugués de spermidine	93
c/ Suite de l'analyse de <i>At2g23510</i>	94
d/ Les gènes At5g41040 et At5g63560 ne sont pas impliqués dans la	
synthèse de glucosinolates de la graine	94
4/ Analyse des gènes BAHD exprimés spécifiquement dans les bourgeons floraux a/ Les mutants des gènes <i>At3g23840</i> et <i>At4g29250</i> ne présentent pas de	95
phénotype, le mutant de $At1g03390$ présente un phénotype subtil	95
b/ Les mutants des gènes exprimés dans les bourgeons floraux ne présentent pas de chémotype	95
c/ Contexte phylogénétique des BAHD exprimées dans les bourgeons floraux	96
d/Expression tissulaire de <i>At4g29250</i>	96
5/ Utilisation du mutant <i>male sterility1 (ms1)</i> comme révélateur de l'implication	20
de gènes dans la paroi/manteau du pollen	97
Chapitre 3. Discussion et Perspectives.	99

Chapitre 3. Discussion et Perspectives.

Conclusion générale

Matériel et Méthodes	102
 I – Préparation de l'ADN 1/Amplification des fragments d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) 2/ Purification phénol/chloroforme du fragment de PCR 3/ Digestion de l'ADN par des endonucléases de restriction et déphosphorylation 	102 102 103
du vecteur 4/ Analyse des fragments d'ADN digérés sur gel d'agarose et purification 5/ Ligation rapide de l'insert et du vecteur	103 103 104
II – Clonages 1/ Souches bactériennes a/ E. coli DH5α b/ E. coli BL21-G612	104 104
2/ Vecteurs a/vecteur de sous clonage b/ vecteur d'expression bactérien c/ vecteur d'expression de plantes d/ vecteur d'analyse du promoteur e/ vecteur pour le RNAi	104 104 105 105 105 105
III – Méthodes de clonage	106
 IV – Méthodes de transformation Transformations bactériennes	106 106 106 107
V – Matériel végétal et conditions de culture	107
VI – Analyse et caractérisation de lignées d'insertion T-DNA	108
1/ Extraction d'ADN génomique « quick and dirty »2/ Génotypage par PCR	109 109
VII – Extraction et analyses métaboliques 1/ Extraction de phénols solubles	110 110
 VIII – Analyses du pollen Préparation de pollen Coloration Auramine-O Microscopie électronique à transmission Microscopie électronique à balayage Germination <i>in vitro</i> du pollen Germination <i>in vivo</i> du pollen, coloration du pistil à l'Aniline Coloration d'Alexander 	110 110 110 111 111 111 112 112
IX – Histologie 1/ Coloration GUS 2/ Immunocytochimie	112 112 112

X – Production de protéines recombinantes en système bactérien 1/ Amplification de la séquence codante du gène d'intérêt et clonage dans le vecteur	113
d'expression	113
2/ Production hétérologue de la protéine par <i>E. coli</i>	114
XI – Activités enzymatiques	114
1/ Conditions d'incubation	114
2/ Analyse des produits de réaction	115
XII – Analyse des protéines	115
1/ Extraction de protéines à partir de matériel végétal	115
2/ Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide en conditions	
dénaturantes (SDS-PAGE)	115
3/ Révélation des protéines au bleu de Coomassie	116
4/ Transfert et immunodétection des protéines (western blot)	116
XIII – Protocole d'immunisation des lapins	116
XIV – Stress biotiques ou abiotiques d'Arabidopsis	116
1/ Infection d'Arabidopsis pas Botrytis cinerea	116
2/ Infection d'Arabidopsis pas Pseudomonas syringae	117
3/ Traitement du pollen aux UV-B	117
XV – Analyses phylogénétiques	117

Bibliographie

118

Introduction générale

Introduction générale

I – Préambule : le métabolisme secondaire des plantes et l'évolution

Les organismes vivants sont constamment confrontés à des situations nouvelles auxquelles ils sont tenus de s'adapter pour vivre ou pour survivre. Cette adaptation se repose sur la capacité de l'organisme à modifier par exemple son comportement ou son métabolisme, pour mieux accepter la contrainte ou pour agir sur elle et la diminuer. Cette plasticité intrinsèque des organismes est par nature limitée et peu évolutive, restreinte aux ressources dont dispose le patrimoine génétique de l'organisme. Sur des temps bien plus longs, les organismes vivants ont également recours à une adaptation basée sur des phénomènes évolutifs. L'influence de l'environnement aboutit à une réponse adaptative de l'organisme, dont la vitesse dépend de la pression sélective subie, c'est-à-dire la nécessité de changement pour l'organisme.

Si pour faire face aux situations nouvelles, l'homme dispose de son intelligence, les animaux de leur mobilité et les procaryotes de leur reproduction rapide associée à une plasticité génétique remarquable, les plantes notamment de par leur sédentarité semblent particulièrement vulnérables face aux agressions de leur environnement. Cependant, ne serait-ce qu'au regard de leur large distribution sur la surface de la Terre, les plantes montrent qu'elles sont remarquablement adaptées aux contraintes de leur environnement. Les travaux de ces dernières années ont permis de mettre en évidence une partie de l'incroyable complexité des stratégies mises en place pour tirer profit de leur environnement et opposer une défense efficace vis-à-vis des attaques subies.

Un exemple remarquable consiste en l'apparition de systèmes vasculaires (il y a plus de 400 millions d'années), permettant de faire circuler l'eau dans la plante et, en lui conférant une rigidité, de « diriger » les organes photosynthétiques vers la lumière. Dans cet exemple, le phénomène adaptatif repose sur la capacité de synthèse de composés chimiques, permettant *in fine* la synthèse de la lignine, un constituant majeur du système vasculaire. D'une manière générale, au cours de l'évolution, les plantes ont su détourner les processus biochimiques généraux qui définissent le **métabolisme primaire**, pour produire une quantité remarquable de composés différents (plusieurs centaines de milliers). Ce métabolisme dit « **secondaire** » est d'une complexité sans égal dans le monde du vivant et reflète la complexité des situations auxquelles les plantes sont amenées à se retrouver confrontées. Pour expliquer la diversité structurale des métabolisme primaire, donc le reflet d'un jeu aléatoire de la nature (Wink, 2003). Mais depuis la fin du XVIIème siècle, notamment depuis la découverte du rôle antimicrobien de phytoalexines issues du métabolisme secondaire, son aspect essentiel pour la survie et le développement de la plante a commencé à être appréhendé.

De nos jours, il ne fait plus de doutes que le métabolisme secondaire est issu de l'adaptation des plantes au cours de l'évolution. Probablement par un jeu de duplication génique, de transfert génique, l'ensemble associé à des mutations entraînant une variabilité catalytique, le métabolisme secondaire a permis de détourner les processus habituels pour produire, à partir des précurseurs universels issus du métabolisme primaire, une myriade de composés utiles pour la défense et le développement des plantes. C'est le cas par exemple pour la Phenylalanine Ammonia Lyase (PAL), première enzyme du métabolisme des phénylpropanoïdes. De nombreux arguments sont en faveur d'une évolution de l'Histidine Ammonia Lyase (HAL) participant au catabolisme de l'histidine, largement répandu aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes, et aboutissant à la PAL que les premières plantes terrestres auraient acquis via un transfert horizontal de gène (Emiliani et al., 2009). Cet exemple illustre bien l'évolution d'un gène du métabolisme primaire vers un gène du métabolisme secondaire, à l'origine d'une voie de synthèse entièrement nouvelle.

Le métabolisme secondaire subit des perpétuelles modulations avec dans l'ensemble une complexification des réseaux métaboliques. Chaque étape importante de l'évolution, comme par exemple la colonisation du milieu terrestre, s'est accompagnée d'adaptations physiologiques importantes, incluant l'émergence de voies spécialisées entièrement nouvelles. Un des exemples caractéristiques consiste en l'apparition de composés phénoliques au cours de l'évolution. Ces composés présentent des fonctions qui apportent une rigidité structurale, une protection contre la dessiccation, contre les rayonnements UV, la photo-oxydation ou encore les pathogènes. Si les algues vertes (charyophyceae), phylogénétiquement les plus proches des plantes terrestres possèdent quelques composés phénoliques, elles ne possèdent de loin pas la remarquable diversité des composés et des voies de synthèse présentes chez les plantes terrestres, et sont complètement absents chez les algues plus anciennes. Par exemple la lignine, qui apporte la rigidité et l'imperméabilité aux trachéides et vaisseaux conducteurs, n'est présente que chez les plantes vasculaires et absente chez les Bryophytes. Par contre, les lignanes, des précurseurs de la lignine structuralement plus simple, sont présents chez ces premières plantes terrestres (Waters, 2003). De façon similaire les flavonoïdes qui protègent les plantes des rayonnements UV et de la photo-oxydation, sont absents chez les algues vertes et seulement une faible proportion des flavonoïdes présents chez les Angiospermes est retrouvée chez les Bryophytes (Cooper-Driver, 2001).

De même, le polymère de sporopollenine, qui est retrouvé de façon ubiquitaire chez les plantes terrestres, est présent à l'état de trace chez les *Coleochaetes*, des algues proches des plantes terrestres, mais absent chez les algues plus éloignées, indiquant l'importance de l'acquisition du métabolisme correspondant préalablement à la colonisation des milieux secs (Delwiche et al., 1989).

Un autre exemple consiste en la synthèse de l'isoprène, qui intervient dans la protection thermique de la photosynthèse. Les premières plantes terrestres (les hépatiques et les anthocéros) sont complètement dépourvues de ce métabolite alors qu'il est commun chez les mousses et très souvent présent chez les trachéophytes (fougères, conifères, angiospermes) (Hanson et al., 1999). L'hypothèse étant que le passage à un environnement terrestre a provoqué la pression de sélection nécessaire à l'apparition de ce mécanisme de tolérance thermique chez les plantes supérieures. Il aurait alors été transmis comme un caractère ancestral, puis perdu dans certaines lignées pour lesquelles d'autres mécanismes de protection thermique seraient apparus.

Ces quelques exemples illustrent bien l'importance du métabolisme secondaire dans les phénomènes évolutifs. Bien souvent, il permet de faire face à une situation nouvelle, et les plantes particulièrement ont su en tirer profit au regard de la remarquable diversité des métabolites secondaires végétaux par rapport aux autres organismes.

L'approche globale du métabolome d'une plante commence à être envisageable, notamment grâce aux progrès récents des techniques analytiques. La compréhension du métabolisme secondaire dans son ensemble reste cependant un objectif démesuré. Il reste nécessaire de se restreindre à certains choix précis, et notamment de porter une attention particulière aux métabolismes qui présentent une certaine ubiquité dans le règne végétal. L'étude d'une plante modèle, comme *Arabidopsis thaliana*, prend alors tout son sens, permettant une certaine généralisation de la compréhension d'un métabolisme à un ensemble de végétaux.

Historiquement, l'étude du métabolisme a consisté à extraire puis analyser les molécules des plantes, et présente un certain nombre de limites. L'étude des métabolites est très souvent totalement dissociée des mécanismes génétiques qui contrôlent leur synthèse. Inversement, grâce aux avancées importantes réalisées ces dernières années concernant la connaissance du génome des plantes, et notamment depuis le séquençage complet du génome d'Arabidopsis thaliana, des approches complémentaires et prometteuses s'offrent aux biochimistes végétaux. L'ensemble des outils développés se basant sur ces nouvelles données permet à l'approche génomique d'associer l'étude du métabolisme secondaire avec les aspects de structure et de régulation du génome qui le gouverne en amont. Ils permettent donc d'intégrer le métabolisme dans un contexte plus large, qui revient, non plus à étudier les métabolites seuls, mais les gènes et les régulations associées, apportant un angle de vue original pour l'étude de sa fonction biologique. Cet aspect est particulièrement pertinent concernant l'étude du métabolisme secondaire pour lequel une régulation spatio-temporelle est plus la norme que l'exception. Il est alors spécifique d'un organe ou d'un tissu, d'un stade du développement ou de l'exposition à un stress donné. Cette régulation est évidemment essentielle pour que le métabolite assure sa fonction biologique, tout en optimisant les dépenses énergétiques de la plante. L'étude fonctionnelle d'un métabolisme est donc intimement liée à l'étude du/des gène(s) impliqués dans cette synthèse.

L'introduction de ce mémoire va, avant tout, être consacrée à la présentation générale du métabolisme des phénylpropanoïdes. Cette présentation non exhaustive traitera des voies majeures de

ce métabolisme au travers de la description des gènes et enzymes associés, des métabolites formés et de leurs fonctions connues ou supposées. Une attention particulière sera donnée à la voie générale des phénylpropanoïdes d'où tous les métabolites de cette classe dérivent et qui présente un lien étroit avec les travaux exposés plus loin dans ce mémoire. Je traiterai ensuite des voies plus spécialisées de ce métabolisme. J'introduirai par la suite la famille des acyltransférases du type BAHD, dont la caractérisation d'un des membres est rapportée plus loin, je traiterai enfin du métabolisme lié à la synthèse de la paroi pollinique chez les plantes, en exposant les connaissances du moment sur la biochimie et la génétique impliquées dans ce processus.



Figure 1. Squelette de base des phénylpropanoïdes

Squelette phénylpropane : C6 – C3, dérivant du squelette carboné de la phénylalanine, à l'origine des phénylpropanoïdes simples



Figure 2. Voie générale des phénylpropanoïdes

La voie générale des phénylpropanoïdes mène à la synthèse de *p*-coumaroyl-CoA à partir de phénylalanine. Le *p*-coumaroyl-CoA est le point d'entrée de la voie des flavonoïdes et des monolignoles. La voie générale des phénylpropanoïdes consiste en une déamination catalysée par la Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL), en une hydroxylation catalysée par la Cinnamate 4-Hydroxylase (C4H) et en une estérification au coenzyme A (CoA), catalysée par Coumarate 4-ligase (4CL).

1^e Partie. Le métabolisme des phénylpropanoïdes

Le métabolisme des phénylpropanoïdes est un métabolisme secondaire, ubiquitaire et exclusif du règne végétal. Le précurseur général en est la phénylalanine, issue de la voie du shikimate. La plupart des composés de cette famille possède le squelette de base en C6-C3 constitué d'un cycle aromatique (phenyl, C6) et d'une chaîne latérale à trois carbones (propane, C3) issue de la déamination initiale de la phénylalanine (**fig. 1**). Le métabolisme des phénylpropanoïdes présente une diversité chimique remarquable, plusieurs dizaines de milliers de composés différents en sont issus. Mais si certains de ces métabolites sont ubiquitaires chez les plantes (comme les monolignoles, certains flavonoïdes, ...), d'autres présentent une distribution plus spécifique d'un groupe taxonomique ou d'une espèce de plante. Cette distribution particulière fait qu'à ce jour seule une part des phénylpropanoïdes est caractérisée. La diversité chimique est également à l'image de la diversité fonctionnelle associée à ces molécules. Elles interviennent aussi bien dans des processus développementaux comme la lignification, la subérisation, la pigmentation des fleurs ou des tissus, la signalisation et les relations symbiotiques, que dans la protection des plantes en réponse à des stress biotiques ou abiotiques.

D'une façon générale, on schématise la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes en trois parties principales : la voie générale des phénylpropanoïdes d'où découle les deux autres, la voie des monolignoles et la voie des flavonoïdes (**fig. 2**). Je décris ici plus en détail les composés synthétisés par ces voies ainsi que les principales enzymes/gènes qui y participent.

I – La voie générale des phénylpropanoïdes.

Cette voie débute avec la Phénylalanine et aboutit à la synthèse de différents hydroxycinnamoyl-CoAs. Elle constitue la plaque tournante des phénylpropanoïdes, produisant des composés simples, dont tous sont des intermédiaires à partir desquels sont synthétisées différentes familles de composés phénoliques, au travers de voies de synthèse secondaires. Les études génomiques portant sur cette voie de synthèse ont montré son caractère ubiquitaire dans le règne végétal. Très souvent, les gènes intervenant dans la voie générale sont présents sous la forme de petites familles géniques (Boudet, 2007).

Les composés issus de cette voie n'ayant pas en eux-mêmes une fonction biologique, je m'attacherai dans un premier temps à décrire les trois principales étapes menant à leur synthèse, en

m'appuyant sur l'étude des gènes/enzymes impliqués. Je traiterai ensuite des régulations particulières de cette voie.

1/ La Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL)

La première étape de cette voie fait intervenir la Phénylalanine Ammonia Lyase (PAL), qui catalyse la désamination non oxydative de la phénylalanine en acide *trans*-cinnamique. Cette étape constitue le point de branchement entre les métabolismes primaires et secondaires. De par cette position particulière, la PAL régule le flux entrant dans le métabolisme des phénylpropanoïdes. De nombreux travaux décrivent la corrélation observée entre l'expression/l'activité de la PAL et l'augmentation des composés phénoliques en réponse à différents stimuli (voir par exemple la revue (Lois et al., 1989)).

La PAL est codée par une famille génique chez l'ensemble des espèces étudiées (de 2 à 40 gènes). Deux ont été caractérisés chez le tabac, tandis que quatre gènes codant pour des PAL sont présents chez Arabidopsis. D'une façon générale, au moins une des PAL est associée aux processus de lignification, tandis que les autres interviennent dans des voies secondaires ou lors de stress environnementaux. Ainsi chez le peuplier, deux gènes codant pour des PAL ont été clonés. L'expression d'une des isoformes est corrélée à la synthèse des tannins condensés, alors que l'autre semble être impliquée dans la lignification (Kao et al., 2002). Chez Arabidopsis, sur les quatre isoformes, trois seulement semblent être actives métaboliquement. Les études biochimiques sur les protéines recombinantes ont montré que les PAL 1, 2 et 4 possédaient bien une activité PAL avec une efficacité similaire, mais que la PAL3 ne présentait qu'une faible activité. De plus, l'expression de PAL3 est très faible dans tous les tissus, et ne semble pas induite par un quelconque stress. Les autres gènes PAL sont exprimés dans de nombreux tissus (dont les graines, les plantules, les feuilles, les racines, les fleurs, les siliques et la hampe florale), mais les PAL1 et 2 sont exprimées plus abondamment dans les hampes et les racines, et au regard de leur proximité structurale et de la présence d'éléments régulateurs communs au niveau de leur promoteur (notamment le motif conservé « AC » conduisant à une expression dans les tissus vasculaires), ces deux isoformes semblent être préférentiellement impliquées dans la production des monolignoles durant la lignification des tissus vasculaires (Raes et al., 2003).

L'investigation des fonctions individuelles de *PAL1* et 2 d'*Arabidopsis* a été entreprise par Rohde et al. (2004), se basant sur l'étude des mutants d'insertion T-DNA KO correspondants. Aucun phénotype n'est observable chez les mutants simples *pal1* ou *pal2*, et seulement de petites altérations sont observées chez le double mutant, suggérant une redondance fonctionnelle probablement par *PAL4* dont l'expression augmente chez les mutants simples et doubles (Rohde et al., 2004). Toutefois, la caractérisation moléculaire, au niveau du transcriptome et du métabolome, des mutants *pal1* et *pal2*

- 6 -

révèle des rôles distincts des gènes correspondants. En effet, certaines expressions différentielles d'autres gènes biosynthétiques, sont corrélées avec seulement une des deux mutations simples (par exemple *PAL3* et *CCoAOMT7* avec *pal1*), et des études métaboliques montrent des accumulations différentielles de métabolites chez les mutants simples, notamment une quantité de composés phénoliques réduite par rapport au sauvage chez le mutant *pal1* (Rohde et al., 2004).

La régulation de ces petites familles géniques semble donc complexe, avec des complémentations des PAL entre elles, mais qui ne sont pas totales. Aux régulations classiques (transcriptionnelles/traductionnelles), s'ajoutent des régulations par rétro-inhibition ainsi que des modifications post-traductionnelles (Blount et al., 2000; Allwood et al., 1999; Cheng et al., 2001). De plus, certaines isoformes de la PAL peuvent s'associer avec d'autres enzymes de la voie pour former un complexe enzymatique qui permet la métabolisation du composé par les constituants du complexe, sans diffusion et dilution dans le cytosol (« métabolon »). Des travaux sur les deux isoformes de PAL du tabac (PAL1 et PAL2) suggèrent une localisation subcellulaire différente pour chacune. PAL1 est partiellement cytosolique, et partiellement associée à la Cinnamate 4-Hydroxylase (C4H) au niveau du réticulum endoplasmique. La proportion de PAL1 associée est dépendante de la quantité de C4H, et le complexe formé est supposé responsable du "channeling" de l'acide cinnamique. L'isoforme PAL2 est, elle, strictement cytosolique et produit un acide cinnamique cytosolique (Achnine et al., 2004). Les localisations subcellulaires différentes des « pools » d'acides cinnamiques, comme étant la conséquence de l'activité des PAL aux localisations différentes, pourraient aboutir à une partition du flux métabolique dans différentes branches des phénylpropanoïdes, certaines ne requièrant pas l'action de la C4H (celle des salicylates et benzoates, par exemple). Ces travaux ont mis en évidence un niveau insoupconné de régulation métabolique par la localisation subcellulaire des différentes isoformes.

2/ La Cinnamate 4-Hydroxylase (C4H)

La deuxième étape de cette voie générale fait intervenir une monooxygénase, la Cinnamate 4-Hydroxylase (C4H; cyp73A5). Cette enzyme catalyse l'hydroxylation de l'acide cinnamique, en position 4 du cycle aromatique, pour former l'acide *p*-coumarique (**fig. 2**).

La C4H est une enzyme à cytochrome P450. Ces hémoprotéines sont ainsi nommées en raison de leur absorbance maximale à 450 nm quand l'atome de fer de l'hème est complexé avec du CO. Ce type d'enzyme est ubiquitaire dans le monde du vivant, mais est particulièrement représenté chez les plantes qui en possèdent, en général, plusieurs centaines. *Arabidopsis* par exemple en possède 270, intervenant aussi bien dans les métabolismes primaires que secondaires. Ces enzymes occupent une place particulière dans le métabolisme de par le caractère irréversible de la réaction catalysée. Les

étapes correspondantes constituent des « points de non-retour » dans les voies métaboliques et sont souvent des éléments régulateurs de biosynthèses.

Étonnamment, chez *Arabidopsis*, un seul gène *C4H* est trouvé, alors que dans la plupart des autres espèces, on en trouve au moins deux copies (Hotze et al., 1995; Nedelkina et al., 1999; Blee et al., 2001; Betz et al., 2001). D'une façon générale, l'une des deux semble associée à la synthèse de lignine et autres dérivés phénylpropanoïdes, tandis que la fonction de l'autre isoforme reste bien souvent à être caractérisée (Lewis, 1999; Lu et al., 2006). Les études biochimiques avec la protéine recombinante ont permis de montrer la grande spécificité de la C4H pour l'acide cinnamique.

Chez *Arabidopsis* la *C4H* est exprimée dans l'ensemble des tissus, et son expression est également induite par une infection fongique, un stress mécanique et l'exposition à la lumière (Raes et al., 2003; Bell-Lelong et al., 1997; Meyer et al., 1998; Nair et al., 2002). L'activité du promoteur de *C4H* mesurée dans la plante coïncide avec les cellules vasculaires dans la hampe florale et dans les feuilles, tandis qu'il est actif dans toutes les cellules de la racine (Bell-Lelong et al., 1997; Nair et al., 2002).

La répression de l'expression de la C4H dans des plantes transgéniques (Reddy et al., 2005) ainsi que sa mutation chez *Arabidopsis* entraînent des effets pleiotropiques sur les dérivés phénoliques, incluant une forte réduction de la quantité de lignine ainsi qu'une diminution de l'acide chlorogénique et de flavonoïdes chez le tabac (Blount et al., 2000; Srinivasa Reddy et al., 2005). Chez Arabidopsis, les mutants EMS de la *C4H* (*ref3*) présentent une taille réduite associée à une diminution du taux de lignine, d'esters sinapiques et de flavonoïdes. Les mutants *ref* les plus sévèrement touchés dans l'expression présentent également une stérilité mâle (Ruegger and Chapple, 2001).

3/ La Coumarate 4-ligase (4CL)

La 4CL catalyse la formation ATP-dépendante d'un ester de CoA à partir des acides hydroxycinnamiques (**fig. 2**). Ces esters de CoA sont les précurseurs de nombreux métabolites et sont les points de branchement principaux entre la voie générale des phénylpropanoïdes et les voies secondaires (dont la voie de la lignine et des flavonoïdes). Ces intermédiaires constituent des formes activées des acides hydroxycinnamiques, et semblent jouer un rôle important dans les synthèses sachant que de nombreuses études démontrent que les hydroxylations et méthoxylations sur le cycle aromatique, nécessaires pour la synthèse des monolignoles, se faisaient sur des esters de CoA (hydroxycinnamoyl-CoA), ou des dérivés, et non pas sur les formes acides.

Les 4CL ont été clonées chez de nombreuses espèces de plantes, où elles se présentent en petites familles géniques. Les études d'expression des 4CL montrent qu'elles s'expriment dans la

plupart des tissus de la plante, et répondent à la blessure et à l'infection fongique, au moins pour une isoforme (Baucher et al., 1998).

Les analyses biochimiques réalisées ont montré des différences de spécificité, mais dans l'ensemble, une préférence pour le *p*-coumarate, puis pour le férulate et le caféate, d'où le nom générique de cette famille d'enzyme. Très peu d'isoformes présentent une activité significative pour le sinapate, en accord avec les données *in vivo* qui démontrent que les acides férulique et sinapique ne sont pas des intermédiaires de la synthèse des unités monolignoles G et S (Humphreys et al., 1999; Yamauchi et al., 2003; Costa et al., 2005). Cependant, certaines isoformes de 4CL, notamment 4CL4 d'*Arabidospsis*, présentent une activité préférentielle pour l'acide sinapique. Cette spécificité particulière, qui a également été trouvée pour une isoforme de soja, semble définir une nouvelle fonction métabolique qu'il reste encore à découvrir (Ehlting et al., 1999; Lindermayr et al., 2002).

La présence de plusieurs isoformes, associée à une localisation tissulaire différentielle et à des spécificités de substrat différentes, semble définir des fonctions propres à chaque isoforme. Chez *Arabidopsis*, il existe quatre membres 4CL, dont les enzymes correspondantes ont des spécificités de substrat et des activités différentes pour les acides hydroxycinnamiques (Ehlting et al., 1999). Les données histologiques, biochimiques et métabolomiques vont dans le sens de l'implication des 4CL 1 et 2 dans les processus de lignification et de la 4CL 3 dans la synthèse de flavonoïdes (Ehlting et al., 1999). Chez le tabac, qui possède deux isoformes, une est principalement exprimée au niveau des vaisseaux du xylème et semble associée aux processus de lignification en utilisant l'acide caféique, tandis que l'autre est principalement exprimée au niveau de l'épiderme, utilise l'acide coumarique et semble associée à la synthèse des flavonoïdes (Harding et al., 2002; Hu et al., 1998).

Encore une fois, la complexité résultante des redondances partielles dans cette famille génique rend difficile l'étude fonctionnelle de chaque membre. L'étude de plantes réprimée pour l'une des isoformes, chez le tabac, *Arabidopsis* et le peuplier, ou l'étude des mutants simples correspondants, montre une répercussion limitée sur la quantité de lignine et de flavonoïdes (Hu et al., 1999; Kajita et al., 1997; Kajita et al., 1996; Lee et al., 1997). Ceci est probablement dû à la complémentation partielle des isoformes entre elles, comme cela est observé pour les PAL. Les spécificités différentielles des isoformes pour leur substrat semblent indiquer la présence de voies alternatives pour la formation des dérivés phénylpropanoïdes. La présence de ces voies parallèles pourrait aboutir à une complémentation métabolique d'une voie par l'autre, dans le cas de la défection de l'une d'elles due à la mutation d'un des gènes impliqués.

4/ Produits dérivés de la voie générale des phénylpropanoïdes et régulations

La voie générale des phénylpropanoïdes n'aboutit pas, à proprement parler, à la synthèse de métabolites présentant par eux-mêmes une vraie fonction biologique. Aucun des produits formés





La voie de synthèse préférentielle est indiquée en gras, avec le nom des enzymes de chaque étape. Les hydroxylase cytochrome P450 dépendantes sont indiquées en rouge, les réductases en bleu et les méthyltransférases en vert. PAL, phénylalanine ammoniac lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; 4CL, *p*-coumarate-CoA ligase; HCT, hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transférase ; C3H, *p*-coumarate 3-hydroxylase ; CCoAOMT, caféoyl-CoA O-méthyltransférase ; COMTI, caféate O-méthyltransférase de classe I ; F5H, férulate 5-hydroxylase ; CCR, cinnamoyl-CoA réductase ; CAD, cinnamyl alcool déshydrogénase; SAD, sinapyl alcool déshydrogénase.

(cinnamate, coumarate et hydroxycinnamoyl-CoA) ne s'accumule dans la plante. Cette voie fournit les précurseurs de voies plus spécifiques conduisant à la lignine, aux flavonoïdes ou d'autres composés phénoliques.

Cette voie générale étant en amont d'un ensemble de voies métaboliques conduisant à la synthèse de composés aux fonctions très différentes, sa régulation est particulièrement importante pour une bonne distribution des flux métaboliques. Ceci explique certainement l'extrême complexité observée pour la régulation de cette voie, à commencer par la présence de familles géniques pour chaque étape catalytique. Les activités et spécificités de substrats différentes des isoformes, associées à une localisation spécifique, permettrait la constitution de « pools » d'intermédiaires métaboliques aux destinées différentes, et apporte un niveau de régulation métabolique supplémentaire et encore très mal connu. Ce type de régulation, associé aux régulations classiques, permet donc à cette voie générale de jouer un rôle essentiel dans l'homéostasie du métabolisme des phénylpropanoïdes.

II – La voie des monolignoles

Cette voie de synthèse aboutit à la production de trois unités monolignoles, précurseurs de la lignine, des lignanes et des phénylpropènes notamment. Les unités monolignoles sont des alcools hydroxycinnamiques, et diffèrent par leur degré de méthoxylation. L'alcool p-coumarylique, précurseur des unités *p*-hydroxyphényles (H), est non méthoxylé, l'alcool coniférylique, précurseur des unités gaiacyles (G), est mono-méthoxylé et l'alcool sinapylique, précurseur des unités syringyles (S), est diméthoxylé. Ainsi leur synthèse se résume à une série d'hydroxylations et de méthylations pour former les fonctions méthoxyles, associées à deux étapes de réduction. Les enzymes catalysant ces réactions ont été caractérisées. Deux monooxygénases à cytochrome P450 (C3H et F5H) sont responsables des hydroxylations, deux méthyltransférases (CCoAOMT et COMT I) catalysent les méthylations, enfin les réductases CCR et CAD/SAD interviennent pour les étapes finales de réduction (fig. 3). Ces études ont permis de définir les réels intermédiaires physiologiques, donc le flux métabolique préférentiel aboutissant aux monolignoles. De façon surprenante, il s'avère que ces étapes d'hydroxylation et de méthylation ne sont pas faites sur les formes acides des hydroxycinnamiques, contrairement à la C4H qui hydroxyle l'acide cinnamique en acide pcoumarique. Par exemple, la F5H, responsable de l'hydroxylation en position 5 du cycle, est mille fois plus active sur la forme aldéhyde que sur la forme acide, suggérant ainsi l'utilisation in planta de cet intermédiaire réduit (Humphreys et al., 1999).

Récemment, une dimension nouvelle a dû être prise en compte avec la découverte et la caractérisation de la Cinnamate Hydroxylase (C3H) et de l'hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate hydroxycinnamoyltransférase (HCT). La C3H catalyse l'hydroxylation en C3, non pas sur les formes acides ou estérifiées au CoA, mais sur deux nouveaux intermédiaires dans la voie : le coumaroyl



Figure 4. Réactions impliquant HCT et CH3 pour la synthèse des monolignoles méthoxylés

PAL, phénylalanine ammoniac lyase ; C4H, cinnamate 4-hydroxylase ; 4CL, *p*-coumarate-CoA ligase; HCT, hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transférase ; C3H, *p*-coumarate 3-hydroxylase ; HQT, hydroxycinnamoylCoA Quinate Transférase.

shikimate et le coumaroyl quinate (Schoch et al., 2001; Franke et al., 2002), lesquels sont synthétisés par HCT (Hoffmann et al., 2003; Hoffmann et al., 2004) (**fig. 3**).

Je ne traiterai pas ici de l'ensemble des gènes/enzymes intervenant dans la voie des monolignoles, mais des deux premières étapes, impliquant HCT et C3H, qui présentent un rapport avec le travail présenté plus loin dans ce manuscrit.

1/L'hydroxycinnamoyl-CoA : shikimate hydroxycinnamoyltransferase (HCT)

La première activité HCT a été caractérisée chez le tabac en suivant son activité hydroxycinnamoyl-CoA thiolestérase. L'enzyme a été purifiée, et le gène correspondant a été cloné chez le tabac et chez *Arabidopsis* (Hoffmann et al., 2003; Hoffmann et al., 2004), puis l'étude de sa fonction a été entreprise par une approche de gène silencing. Les plantes réprimées pour *HCT*, chez le tabac et *Arabidopsis*, montrent une diminution importante de la quantité de lignine et une modification majeure de sa composition. Les unités G et S, normalement majoritaires, sont remplacées par les unités H non méthoxylées, démontrant le caractère essentiel de HCT dans la synthèse des unités méthoxylées de la lignine.

HCT est une acyltransférase appartenant à la superfamille des BAHD. Elle catalyse la conversion des hydroxycinnamoyl-CoA en leur ester shikimique ou quinique correspondant. La meilleure activité, chez le tabac et chez *Arabidospsis*, s'observe pour le shikimate et le coumaroyl-CoA, pour former le coumaroyl shikimate. Ceci est en accord avec les données enzymologiques de la C3H (voir plus loin), qui indiquent une spécificité particulière pour l'hydroxylation du coumaroyl shikimate. HCT catalyse également la réaction inverse, pour former les esters de CoA à partir des esters shikimiques ou quiniques du caféoyl notamment (Hoffmann et al., 2001). Elle pourrait donc jouer un rôle critique en amont et en aval de la C3H pour l'hydroxylation en C3 du cycle aromatique des phénylpropanes (**fig. 4**).

La fusion promoteur/GUS chez les plantes d'*Arabidopsis* transgéniques montre une expression de HCT dans la plupart des tissus de la plante. Les observations histologiques indiquent cependant une expression préférentielle dans les tissus lignifiés comme le xylème. Dans l'ensemble, son expression est forte dans tous les tissus vasculaires lignifiés (Hoffmann et al., 2004). Contrairement aux enzymes de la voie générale, aucune induction de l'expression suite à un stress biotique ou abiotique n'est observée pour *HCT* (Besseau, 2007). Il semble donc que HCT soit spécifiquement impliquée dans la synthèse des monolignoles incorporés *in fine* dans la lignine. Ceci est en accord avec le fait que des hydroxycinnamoyl esters, comme le sinapoylmalate ou la sinapoylcholine, ne sont pas affectés chez les plantes réprimées pour *HCT*.

- 11 -

Une analyse bioinformatique indique la présence d'orthologues d'*HCT* potentiels chez l'ensemble des plantes vasculaires testées où elle est présente en une seule copie dans la plupart des cas. HCT a par la suite été caractérisée chez d'autres espèces, dont le pin (*Pinus radiata*) (Wagner et al., 2007), la luzerne (*Medicago sativa*) (Shadle et al., 2007) ou encore l'artichaut (*Cynara scolymus*) (Comino et al., 2009).

La présence d'une seule isoforme d'HCT chez la plupart des espèces, associée aux données *in planta* montrant une affectation limitée des plantes réprimées de la synthèse des autres composés phénoliques que la lignine, suggère une spécialisation de cette enzyme et la définition d'une voie spécifique de la lignine. Cependant, si HCT n'est pas responsable de l'accumulation normale de sinapoylmalate chez *Arabidopsis*, elle l'est pour la suraccumulation observée suite à un stress lumineux (Besseau et al., 2007). Cette voie constituerait donc également une voie alternative qui pourrait être mobilisée en fonction des conditions physiologiques.

2/ La Coumarate 3-Hydroxylase (C3H / CYP98A3)

Le nom de la C3H vient de son activité supposée sur l'acide coumarique, mais récemment elle a été caractérisée comme métabolisant préférentiellement les esters shikimiques et quiniques de l'acide coumarique en leurs esters d'acide caféique correspondant (**fig. 3**).

Le gène *C3H* a été cloné en 2001 par deux groupes de recherche différents, utilisant des approches complémentaires. L'un a employé une approche de génomique fonctionnelle (Schoch et al., 2001), et l'autre, une approche de génétique classique sur des mutants de la C3H (Franke et al., 2002). Comme la C4H, la C3H est une monooxygénase à cytochrome P450. Elle appartient à la sous-famille des CYP98. Les études enzymologiques *in vitro* utilisant la protéine exprimée dans la levure ont montré une activité d'hydroxylation NADPH dépendante en position *meta* du cycle aromatique des esters shikimiques et quiniques de l'acide coumarique. Cette activité est très faible pour l'acide coumarique libre et l'ester de CoA correspondant, mais ceci est en accord avec l'activité de HCT qui catalyse la formation des esters shikimique et quinique du coumarate. Il semble donc qu' *in planta*, la synthèse des monolignoles passe par ces esters particuliers.

L'étude des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* exprimant une fusion pC3H:: GUS a révélé une expression dans tous les organes de la plante, et principalement au niveau des tissus vasculaires de la hampe et des racines. L'expression de C3H est également induite par la blessure (Schoch et al., 2001; Nair et al., 2002). D'une manière générale, le patron d'expression de la C3H chez *Arabidopsis* est similaire à celui de *HCT*.

Les mutants de la C3H ainsi que les plantes cosuppressées ont une taille fortement réduite et une coloration pourpre due à l'accumulation de flavonoïdes dans les feuilles et les tiges. Les études

Introduction générale

biochimiques montrent une diminution importante de la quantité de lignine (de l'ordre de 70%) et une modification remarquable de sa composition. Les unités monolignoles incorporées sont pour la grande majorité des unités H non méthoxylées, présentes habituellement à l'état de trace chez la plante sauvage. La mutation de la C3H affecte également la synthèse de sinapoyl malate, le mutant *ref8* de la C3H en étant quasiment dépourvu, remplacé par une accumulation d'esters coumariques (Franke et al., 2002). Cependant, dans une autre étude portant sur des plantes cosuppressées pour *C3H*, l'accumulation du sinapoyl malate n'est quasiment pas affectée, alors que la lignine reste largement modifiée (Abdulrazzak et al., 2006). La faible expression rémanente des plantes cosuppressées mène, semble-t-il, en priorité à la synthèse du sinapoyl malate, avant celle des unités méthoxylées de la lignine. Cette même étude fait état d'une lignification ectopique dans la racine du mutant, avec une proportion non négligeable d'unités méthoxylées (G et S). Cette étude démontrerait la présence d'une voie alternative pour la *méta*-hydroxylation des phénylpropanoïdes, inconnue et principalement active dans la racine.

Les phénotypes et chémotypes observés chez les mutants *c3h* sont très semblables à ceux observés chez les plantes HCT RNAi. La forte réduction de lignine, et notamment des unités méthoxylés G et S, démontre bien l'implication des deux gènes dans leur synthèse, notamment pour la *meta* hydroxylation des phénylpropanes via les esters particuliers du quinate et du shikimate.

3/ Produits et fonctions dérivant de la voie des monolignoles

La voie des monolignoles aboutit à la synthèse de monomères de la lignine, correspondants à des alcools hydroxycinnamiques plus ou moins substitués. Respectivement, on retrouve l'alcool *p*-coumarique (unité H non méthoxylé), l'alcool coniférylique (unité G, mono méthoxylé) et l'alcool sinapique (unité S, diméthoxylé), la proportion des trois unités dépendant de chaque espèce de plante. Les monolignoles sont les précurseurs de la lignine, des lignanes et des phénylpropènes. Voici détaillée leur constitution chimique et leur fonction chez les plantes.

a/ La lignine

La lignine est le principal biopolymère structural des plantes supérieures, et le plus abondant sur Terre après la cellulose. C'est un hétéropolymère complexe, constitué uniquement de dérivés phénylpropanes et qu'on ne trouve que chez les plantes vascularisées, c'est-à-dire les Angiospermes, les Gymnospermes et les Ptéridophytes.





(A) lignine d'Angiosperme, (B) lignine de Gymnosperme. Le schéma ne tient pas compte de la fréquence des différents types de liaison intramoléculaires. En orange sont indiquées les liaisons phényl-coumaranes (β -5), en bleu, les liaisons résinols (β - β), en rouge, les liaisons biphényles 5-5, en vert, les liaisons β -O-4 et en violet, les liaisons diarylpropanes (β -1). Les polysaccharides pariétaux sont liés aux monomères de la lignine par des liaisons esters (avec les fonctions hydroxyles des carbones α et γ des chaînes latérales) ou par des liaisons éthers (avec la fonction hydroxyle en position 4).

La lignine est principalement synthétisée dans les vaisseaux conducteurs comme le xylème, mais également dans les tissus de soutien comme le sclérenchyme. Enfin, la lignine est constituante de la paroi secondaire de la majorité des cellules végétales. Elle assure une rigidité mécanique aux cellules et aux tissus, et de par son caractère hydrophobe, rend les cellules imperméables à l'eau, permettant notamment aux vaisseaux conducteurs de transporter la sève dans toutes les parties de la plante (Inoue et al., 1998). La lignine joue également un rôle dans les mécanismes de défense de la plante, en constituant une barrière physique, génétiquement inductible en réponse à une attaque microbienne (Baldridge et al., 1998; Hatfield and Vermerris, 2001; Jaeck et al., 1992; Lawton and Lamb, 1987; Ni et al., 1996).

La polymérisation des unités monolignoles pour former la lignine n'est pas encore correctement appréhendée, mais devrait reposer sur un processus oxydatif impliquant des polyphénols oxydases (peroxydases et laccases). Ces enzymes permettraient la formation de radicaux libres, lesquels pourraient se polymériser spontanément en formant des liaisons éthers ou C-C (**fig. 5**). Cependant, de nombreux doutes subsistent sur les enzymes impliquées et surtout l'intervention ou non de glycoprotéines pour un contrôle biochimique de la polymérisation plutôt qu'un processus aléatoire (Koutaniemi et al., 2005; Lewis, 1999; Sederoff et al., 1999; Davin and Lewis, 2005).

La structure même de la lignine est dépendante de la proportion des différentes unités qui la composent, et cette proportion est très variable en fonction de l'appartenance taxonomique de l'espèce considérée, du type cellulaire, du stade de développement ou des conditions environnementales. La lignine des Ptéridophytes et des Gymnospermes est essentiellement constituée d'unités G, tandis que la lignine des Angiospermes contient à la fois des unités G et des unités S (**fig. 5**). Les unités H sont dans l'ensemble peu représentées. Quasiment absentes chez les Dicotylédones, elles sont plus abondantes chez les Gymnospermes et les Monocotylédones, mais c'est chez les graminées qu'elle sont présentes en plus grandes quantités (Monties, 1989; Baucher et al., 1998).

Ces différences entre taxons viendraient de l'arsenal enzymatique différent dont disposent les plantes. La présence ou la spécificité de substrat des enzymes n'est pas encore convenablement appréhendée, mais par exemple, il n'existe pas de preuves de l'existence de F5H qui catalyse l'hydroxylation pour la synthèse des unités S chez les Gymnospermes. Ceci pourrait expliquer l'absence d'unités S dans la lignine des plantes de cet embranchement.

Les variabilités dans la composition de la lignine s'observent aussi entre les tissus. Par exemple chez les Angiospermes, les vaisseaux conducteurs du xylème sont riches en unités G tandis que les fibres sont plutôt riches en unités S (Fergus and Goring, 1970). Ceci s'expliquerait par l'expression tissulaire spécifique des différentes isoformes de la voie de synthèse.



Figure 6. Modèle de dimérisation des monolignols en lignanes.

À partir des monolignoles, la génération des radicaux libres et leur couplage suit le même processus pour la synthèse de la lignine et des lignanes. Cependant, lors de la synthèse de la lignine, le processus de polymérisation continue sur la base des polymères formés, alors qu'elle s'arrête après la dimérisation pour la synthèse des lignanes.

Introduction générale

b/ Les lignanes

Les lignanes constituent une vaste famille de composés que l'on retrouve chez un grand nombre de plantes. Leur structure basique est un dimère de monolignoles, principalement de l'alcool coniférylique, mais l'association des unités entre elles est très variable, expliquant la diversité observée des lignanes (plusieurs milliers de lignanes sont connues). L'association des deux unités pour former les lignanes repose sur un processus identique à la polymérisation de la lignine, avec l'intervention de peroxydases et de laccases pour la formation de radicaux libres intermédiaires. Via une polymérisation aléatoire, ou par l'intervention de protéines facilitant le couplage stéréospécifique, il y aurait formation du dimère (**fig. 6**) (Gang et al., 1999; Boerjan et al., 2003).

Malgré leur distribution dans l'ensemble de règne végétal ainsi que leur diversité remarquable, les fonctions de cette classe de composés restent peu claires. L'activité antimicrobienne des lignanes laisse supposer un rôle dans la défense des plantes, mais de nombreuses interrogations subsistent quant à leurs rôles physiologiques.

Cette synthèse semble dérivée d'un processus ancestral d'où serait apparue la lignine. La synthèse des lignanes est en effet apparue plus tôt dans l'évolution que celle de la lignine, on retrouve des lignanes chez des plantes non vascularisées comme les mousses, et la similarité des synthèses et processus mis en jeu semble appuyer cette hypothèse (Waters, 2003). Les lignanes restent cependant d'un intérêt particulier au regard de leur rôle nutritionnel et médical, depuis la découverte de leurs propriétés antitumorales, antioxydantes, antivirales ou antimicrobiennes par exemple (Saarinen et al., 2005; Bylund et al., 2005; Smeds et al., 2009).

c/ Les phénylpropènes

Les phénylpropènes constituent une classe de métabolites possédant un cycle aromatique substitué associé à une chaîne propényl (**fig. 7**). On les retrouve majoritairement chez les Angiospermes et de façon plus minoritaire chez les Gymnospermes. Les phénylpropènes sont principalement associés à des fonctions de défense et de communication inter-spécifique. Comme beaucoup sont toxiques pour les herbivores et les pathogènes, ils sont principalement synthétisés et stockés dans les tissus végétatifs où ils servent de protecteurs chimiques (Gang et al., 2001). Cependant, certains phénylpropènes volatiles sont synthétisés dans la fleur et servent à attirer les insectes pollinisateurs (Pichersky and Niyogi, 2006).

Les phénylpropènes peuvent dériver des trois unités monolignoles, la première étape de leur synthèse étant une acétylation sur la fonction alcool. Ainsi, chez le pétunia, la synthèse de l'isoeugénol fait intervenir une acyltransférase du type BAHD (Dexter et al., 2007). L'acétylation est suivie d'un



Figure 7. Structure et biosynthèse des phénylpropènes.

(A) Diversité des phénylpropènes. La structure basique d'un allyle phénylpropène est montrée. Les iso phénylpropènes diffèrent des allyles par l'emplacement de la double liaison (C7=C8) sur la chaîne propényl. Pour l'eugénol (un allyle phénylpropène), les substituants du cycle sont 2 = H, 3 = OCH, 4 = OH, et 5 = H. Les modifications possibles en méthylenedioxy sont également montrées. (B) Schéma réactionnel simplifié pour la synthèse de l'eugénol à partir de la phénylalanine et passant par l'alcool n-coniférylique. CFAT, coniferyl alcohol acétyl transférase; EGS: eugénol synthase. D'après Louie et al., 2007.

clivage réductif de l'acétate pour former la chaîne propényl (allyl propène ou iso propène) (**fig. 7**). Un exemple chez le basilic (*Ocimum basilicum*) consiste en l'eugénol synthase (ObEGS) qui catalyse la conversion du coniferyl acétate en eugénol, ou chez le pétunia (*Petunia hybrida*), l'isogenol synthase (PhIGS) produisant l'isoeugénol.

Des modifications supplémentaires peuvent intervenir au niveau du cycle aromatique, comme des hydroxylations, des O-méthylations ou la formation de ponts méthylenedioxy (**fig. 7**). Ces modifications peuvent avoir lieu avant la formation de la double liaison (sur l'alcool ou l'ester d'acétate), mais dans tous les cas, une fonction hydroxyle libre en position *para* du cycle semble nécessaire à la réaction de réduction (Koeduka et al., 2006). L'ensemble de ces possibilités catalytiques est à l'origine de la diversité chimique remarquable des phénylpropènes dans la nature.

III – La voie des flavonoïdes

1/ Introduction

Des voies issues du métabolisme des phénylpropanoïdes, les flavonoïdes représentent la plus large classe de métabolites, avec environ 9000 composés caractérisés, toutes espèces végétales confondues (Ferrer et al., 2008). Les flavonoïdes sont des polyphénols retrouvés de façon universelle chez les végétaux à l'exception des algues. Outre leur importance physiologique et écologique, les flavonoïdes ont historiquement été déterminants pour la découverte de phénomènes biologiques fondamentaux, comme les lois de l'hérédité par Mendel, la présence d'éléments transposables et la cosuppression/RNAi (Winkel-Shirley, 2001).

Tous les flavonoïdes dérivent du squelette de base de la chalcone, dont la synthèse fait intervenir la Chalcone Synthase (CHS). Cette enzyme ubiquitaire chez les plantes catalyse la condensation puis la cyclisation des trois unités acétate provenant de la condensation décarboxylative du malonyl-CoA, sur un *p*-coumaroyl-CoA issu de la voie générale des phénylpropanoïdes (**fig. 12**). La chalcone ainsi formée contient deux cycles aromatiques : le cycle B provenant du *p*-coumaroyl et le cycle A issu de la condensation des unités acétates . Très souvent, la condensation par la CHS est suivie d'une isomérisation par la Chalcone Isomérase (CHI), qui aboutit à la formation d'un troisième cycle (un hétérocycle) nommé C (**fig. 8**). Une série d'autres transformations, faisant intervenir des réductases, des hydroxylases, des glycosyltransférases et des acyltransférases, aboutit à la production de la très large variété de flavonoïdes connus. Ceux-ci se répartissent dans différentes classes qui sont les flavones, les flavonoles, les flavandioles, les anthocyanidines et les proanthocyanidines (tannins condensés) (**fig. 9**). Ces classes sont ubiquitaires chez les plantes supérieures, alors que la classe des aurones est largement distribuée mais pas systématiquement présente, et que les isoflavonoïdes



Figure 8. Squelettes carbonés des flavonoïdes.

En bleu, le dérivé phénylpropane C6C3 forme le cycle aromatique B. En rouge, la condensation de trois molécules de malonyl-CoA forme le noyau aromatique A. La chaîne carbonée C3 du phénylpropane fait le lien entre les deux cycles aromatiques et peut former un hétérocycle C.



Figure 9. Les différentes familles de composés du métabolisme des flavonoïdes.

CHS, chalcone synthase; AS, aurone synthase; CHI, chalcone isomèrase; IFS, isoflavone synthase; FNS1/2, flavone synthase 1 et 2; F3H, flavanone 3-hydroxylase; F3'H, flavonoïde 3'5'-hydroxylase; DFR, dihydroxyflavonol 4-réductase; FLS, flavonol synthase; LDOX, leucoanthocyanidine dioxygènase; ANS, anthocyane synthase; LCR, leucoanthocyanidine 4-réductase.

définissent une classe qu'on ne retrouve que chez les légumineuses et quelques autres plantes (Winkel-Shirley, 2001).

Mais si les différences de distribution des flavonoïdes s'observent d'un groupe taxonomique à l'autre, elles s'observent aussi d'une espèce à l'autre, par exemple le maïs (*Zea mays*) est une des rares plantes à synthétiser les déoxyanthocyanines. Il apparaît donc que les branches de flavonoïdes sont apparues à des temps différents au cours de l'évolution, ou que certaines se sont perdues. Enfin, le patron d'accumulation des flavonoïdes dans une même plante est souvent spécifique d'un organe ou d'un tissu, de son stade de développement et des conditions environnementales.

Depuis une quinzaine d'années, de nombreuses avancées ont été faites dans la compréhension des mécanismes de biosynthèse des flavonoïdes d'un point de vue génétique et moléculaire. De nombreux mutants affectés dans la synthèse des flavonoïdes ont été isolés chez de nombreuses plantes, en se basant sur la perte de coloration des fleurs ou des graines du fait de l'absence de flavonoïdes. Le maïs, *Antirrhinum majus* et le pétunia ont été utilisés comme premiers modèles, dont l'étude a mené à la découverte de nombreux gènes structuraux et régulateurs (Holton and Cornish, 1995; Mo et al., 1992). Cependant les dernières grandes avancées ont été réalisées chez *Arabidopsis*, dont la caractéristique est d'avoir toutes les enzymes de la voie de biosynthèse des flavonoïdes (sauf une !) codées par un gène unique. Ce contexte génétique a permis, grâce à une approche de génétique classique, de découvrir des gènes structuraux et régulateurs de cette synthèse, en recherchant des plantes mutées qui présentaient une perte ou une diminution de la coloration des graines. Ces mutants sont appelés «*transparent testa*» (*tt*) en référence à l'absence de tannins condensés au niveau de leurs graines (**fig. 10**) (Shirley et al., 1995). On compte 21 mutants *tt* à ce jour (Buer and Djordjevic, 2009).

La synthèse des flavonoïdes aboutit à une myriade de composés qui se répartissent dans les différentes classes des flavonoïdes. Un nombre de fonctions physiologiques importantes leur sont attribué, mais il n'y a pas de relation évidente entre la structure et la fonction. Par exemple, des anthocyanes sont décrites comme intervenant aussi bien dans l'attraction des insectes pollinisateurs, la protection contre les UV ou encore la défense antimicrobienne. Je ne vais donc pas traiter chaque classe de flavonoïdes et leurs différentes fonctions, mais je vais m'attacher à décrire, de façon non exhaustive, les fonctions les plus connues associées aux flavonoïdes.

- 17 -



Figure 10. Graines d'Arabidopsis sauvage et « transparent testa »

(A) graines d'*Arabidopsis* sauvage (écotype Col-0), (B) graines du mutant *transparent testa 4 (tt4)* affectés dans la synthèse de la Chalcone Synthase (CHS). L'absence de tannins condensés dans l'épiderme des graines de plantes déficientes pour la synthèse des flavonoïdes a constitué le crible pour l'isolement des mutants *transparent testa*.
2/ Fonctions associées aux flavonoïdes

a/ coloration des tissus/attraction des pollinisateurs

Ce sont en très grande majorité les flavonoïdes de la classe des anthocyanes qui apportent la coloration de tissus végétaux. Les anthocyanes ont la particularité d'avoir un spectre d'absorption large dans le visible. Leur absorption maximale, donc leur couleur, est dépendante du degré d'hydroxylation du cycle B, mais surtout du pH, de leur complexation avec des métaux et de leur association avec des flavones (**fig. 11**). La plante dispose donc, grâce aux anthocyanes, d'une large palette de couleur. Et si ce sont les caroténoïdes qui sont, dans la plupart des cas, responsables de la couleur jaune, ce sont les flavonoïdes qui sont presque toujours responsables des couleurs rouge, pourpre, orange ou bleu (Iwashina, 2003).

D'une façon générale, les anthocyanes s'accumulent dans les tissus floraux, notamment dans les pétales, et dans les fruits matures. La présence de ces couleurs vives pourrait jouer un rôle dans l'attirance des insectes pollinisateurs qui dispersent le pollen, ou des animaux frugivores pour la dispersion des graines (Willson and Whelen, 1990; Weiss, 1991). La majorité des fleurs des plantes entomophiles sont colorées par des pigments. Mais en plus des anthocyanes dont la coloration est intense, les flavones et la flavonoles, quasiment incolores, interviennent aussi dans l'attraction des insectes pollinisateurs. En effet, il a été montré que quelques insectes et notamment les abeilles, étaient capables de voir les UV-A dans lesquels ces pigments absorbent. De plus, leur présence est courante au niveau des organes floraux (Iwashina, 2003). D'un autre coté, les isoflavonoïdes, flavanones, flavanes et tannins condensés ne semblent pas participer à l'attraction des insectes pollinisateurs, au regard de leur absence des fleurs et de leur absorption maximale dans des longueurs d'onde que les insectes ne peuvent pas discriminer.

b/ défense induite contre les pathogènes : les phytoalexines

Les phytoalexines sont des composés de faible poids moléculaire, synthétisés en réponse à une attaque microbienne autour du site d'infection. Elles présentent des activités antimicrobiennes plus ou moins spécifiques qui ralentissent ou stoppent la propagation du pathogène. Dans cette famille de composés, se retrouve aussi bien des phénylpropanoïdes comme les coumarines ou les stilbènes que des alcaloïdes ou des terpenoïdes. Certains flavonoïdes ont également été décrits comme étant des phytoalexines chez différentes plantes. Des aurones, des flavonoles ou des deoxyanthocyanidines sont notamment induites au niveau des sites d'infection, et présentent des activités antimicrobiennes élevées (Iwashina, 2003; Dixon and Paiva, 1995). Cependant ce sont surtout les isoflavonoïdes,



Fig. 11. Changements structuraux des anthocyanidines liés au pH ou à leur complexation avec un métal.

comme la médicarpine ou la pisatine, qui sont les phytoalexines les plus variées, et constitueraient un système de défense plus évolué chez les légumineuses (Hammerschmidt, 1999).

c/ protection contre les UVs

La lumière est indispensable à la plante à tous âges de son développement, mais la lumière solaire contient une part de rayonnements UV, principalement des UV-B (280-320nm), nocifs pour la plante. Ceux-ci provoquent des dommages importants, comme la dimérisation des thymines de l'ADN ou l'oxydation des lipides membranaires et des protéines (Ries et al., 2000). Pour éviter ces dommages, la plante a développé des mécanismes efficaces de protection et de réparation (Britt, 1996). Une de ces protections consiste en la synthèse de pigments absorbant les UV-B, parmi lesquels les flavonoïdes.

Contrairement aux anthocyanes, les flavonols (kaempférol et quercétine) absorbent principalement dans la gamme des UV-B. L'étude de leur synthèse a montré une accumulation particulière dans l'épiderme supérieur de la feuille (Schmelzer et al., 1988) et une stimulation de leur synthèse suite à une exposition aux UV (Chappell and Hahlbrock, 1984; Ryan et al., 2001). Ces données ont longtemps laissé supposer un rôle protecteur des flavonoles contre les rayons UV. La preuve en a été apportée par l'étude de mutants d'*Arabidopsis* déficients pour la synthèse des flavonoïdes, et qui sont hypersensibles aux UV-B (Li et al., 1993; Lois and Buchanan, 1994; Landry et al., 1995).

Les anthocyanes présentent également un spectre d'absorption recouvrant partiellement celui de l'ADN lorsqu'elles sont acylées par des hydroxycinnamates. La synthèse de certaines de ces anthocyanes particulières est induite suite à l'exposition aux UV, indiquant un rôle protecteur de ces flavonoïdes (Mori et al., 2005). Ce rôle physiologique des anthocyanes est illustré chez *Ipomoea tricolor* par Mori et al. (2005) qui ont montré la fonction protectrice d' une anthocyanine polyacylée contre les UV-B.

d/ rôle dans la fertilité mâle

Les flavonoïdes sont présents au niveau du pollen de toutes les plantes supérieures testées à ce jour (Ylstra et al., 1996), il s'agit dans la plupart des cas de flavonoles. Cependant, cette ubiquité ne révèle pas une conservation stricte du rôle physiologique des flavonoïdes pour la fertilité mâle. En effet, des rôles différents leur sont attribués en fonction des espèces.



Figure 12. Biosynthèse comparée de stilbènes par la STS et de flavonoïdes par la CHS.

La chalcone synthase (CHS) et la stilbène synthase (STS) catalysent la formation d'un intermédiaire tétrakétide identique à partir de *p*-coumaroyl-CoA et de trois malonyl-CoA. Cet intermédiaire subit alors une cyclisation différente pour former la chalcone ou le resvératrol. Le resvératrol peut être modifié par d'autres enzymes pour former différents stilbènes. UGT, UDP-glucose transférase; OMT, O-méthyltransférase.

Les flavonoïdes favorisent la formation du tube pollinique chez de nombreuses espèces, incluant des *Brassicaceae*. Par exemple, la quercetine (une flavonole) augmente la croissance du tube pollinique chez *Brassica oleracea* (Sedgley, 1975). Chez le maïs et le pétunia, il a été démontré que l'absence de flavonoïdes, par mutation ou répression de la *CHS*, provoque la stérilité mâle de ces plantes, dont le tube pollinique est aberrant et non fonctionnel (Van der Meer et al., 1992; Mo et al., 1992), alors que la fertilité est restaurée par application externe de flavonoles (Ylstra et al., 1994). Cependant, l'étude de mutants d'*Arabidopsis*, du persil et d'*Anthirrinum* dans la voie de synthèse des flavonoïdes, et notamment de mutants de la *CHS* caractérisés par une absence totale de flavonoïdes, indique que les flavonoïdes ne sont pas indispensables à la fertilité mâle chez ces plantes (Ylstra et al., 1996; Burbulis et al., 1996). Le mécanisme par lequel les flavonoles interviennent dans la formation du tube pollinique demeure inconnu à ce jour.

e/ régulation du transport de l'auxine

L'auxine est une phytohormone indispensable au développement des plantes. Elle est synthétisée dans l'apex apical, puis migre dans le reste de la plante grâce à un transport basipète actif, essentiel à ses fonctions (organogenèse, dominance apicale, élongation cellulaire, ...). Les flavonoïdes, et notamment les flavonoles, sont depuis longtemps suspectés d'intervenir dans la régulation du transport de l'auxine. Des études *in vitro* ont démontré que les aglycones de flavonoles peuvent entrer en compétition avec un inhibiteur du transport de l'auxine (l'acide naphtylnapthalamique) pour son site de fixation membranaire (Jacobs and Rubery, 1988; Faulkner and Rubery, 1992; Bernasconi et al., 1996). Par la suite, une augmentation du transport d'auxine a été observée chez le mutant *tt4* de la *CHS*, exempt de flavonoïdes (Peer et al., 2001; Buer and Muday, 2004).

Récemment, l'étude de HCT, intervenant dans la synthèse des monolignoles, a apporté des éléments nouveaux. La suppression par silencing de l'expression de *HCT* provoque un phénotype de nanisme des plantes associé une forte accumulation de flavonoïdes dans les feuilles et les tiges. Besseau et al. (2007) expliquent cette accumulation par une redirection du flux métabolique, de la voie des monolignoles vers le métabolisme des flavonoïdes, le *p*-coumaroyl-CoA étant le substrat commun à HCT et CHS. Dans les plantes suppressées pour HCT, le transport d'auxine est réduit, ceci proportionnellement à l'accumulation des flavonoïdes dans les différentes lignées. Le croisement de ces plantes avec une lignée silencée pour la CHS restaure une taille normale des plantes, indiquant clairement l'implication unique des flavonoïdes dans la réduction de la taille des plantes et du transport de l'auxine (Besseau et al., 2007).



Figure 13. Voie de biosynthèse des coumarines et furanocoumarines à partir du métabolisme des phénylpropanoïdes.

PAL, phénylalanine ammoniac lyase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase.

Les flavonoles semblent donc être des régulateurs négatifs du transport de l'auxine dans la plante, cependant les mécanismes moléculaires ou de signalisation mis en jeu sont encore totalement inconnus.

IV – Autres voies dérivant de la voie générale ou des voies secondaires : nature et fonction des produits

1/ Les stilbènes

Les stilbènes sont des polyphénols constitués de deux cycles aromatiques liés par une chaîne à deux carbones (**fig. 12**). Les stilbènes sont retrouvés chez les Bryophytes, les Ptéridophytes, les Gymnospermes et les Angiospermes avec plus de 300 composés connus. Cependant, ils ne sont pas ubiquitaires chez les végétaux, leur présence est restreinte à un nombre assez limité d'espèces comme le pin, la vigne ou l'arachide (Schroder et al., 1988; Schanz et al., 1992; Sparvoli et al., 1994; Raiber et al., 1995).

La première étape de leur synthèse fait intervenir la Stilbène Synthase (STS), qui catalyse la condensation du *p*-coumaroyl-CoA avec trois unités acétate provenant du malonyl-CoA accompagné d'une décarboxylation. La STS produit le resvératrol, un des stilbènes les plus courants, qui peut être modifié par méthylations, glycosylations ou polymérisations par exemple pour former une myriade de composés différents (**fig. 12**). La STS est très proche de la CHS, toutes deux sont des polykétides synthases de type III, et ne sont pas différenciables au niveau de leur séquence protéique.

Les fonctions associées aux stilbènes sont multiples et leur connaissance n'est pas totale, cependant il semble que ces composés agissent particulièrement dans la protection, constitutive ou induite des plantes, contre les infections fongiques. Les stilbènes présentent de faibles activités antimicrobiennes, mais une forte activité antifongique, en inhibant notamment la germination des spores et la croissance de l'hyphe (Langcake and McCarthy, 1979; Liswidowati et al., 1991; Hain et al., 1993; Yu et al., 2005).

2/ Les coumarines

Les coumarines sont des benzopyranones dérivant des hydroxycinnamates par cyclisation oxydative de la chaîne latérale. Elles sont formées d'un cycle aromatique associé à un cycle pyrone



Figure 14. Modèle de structure et de composition de la cutine et de la subérine.

(A) composition en chaque monomère de la cutine et la subérine des acides gras hydroxylés, en *omega, in chain,* ou époxy sont retrouvés en plus des acides gras simple et des diacides. Des phénols et du glycérol constituent la partie hydrophile du polymère. Les quantités indiquées sont issues de différentes publications, et exprimées en pourcentage de la masse totale du monomère. D'après (Pollard et al., 2008). (B) Modèle de structure de la subérine. Les dérivés hydroxycinnamiques constituent le domaine polyaromatique qui est lié par des glycérols aux acides gras hydroxylés ou non qui constituent le domaine aliphatique. D'après (Graca and Santos, 2007).

Α

(Petersen et al., 1999). Leur présence n'est pas ubiquitaire chez les plantes, mais les 1500 composés connus de cette classe se répartissent dans plus de 800 espèces différentes.

En fonction des espèces, des hydroxylases ou des methyltransférases spécifiques modifient la coumarine ou l'ombélliférone, pour la synthèse de coumarines différentes (**fig. 13**) (Gutierrez et al., 1995; Hurtado-Cabello et al., 1997). Chez certaines familles de plantes, principalement les *Apiaceae*, le *Rutaceae*, les *Moraceae* et certaines *Fabaceae*, on retrouve des furanocoumarines linéaires ou angulaires. Elles dérivent des coumarines suite à l'intervention de cytochromes P450 notamment (Larbat et al., 2007).

Leurs rôles physiologiques semblent plutôt liés à la défense, au regard de leurs propriétés antimicrobiennes, d'absorption des UV ou répulsives. Leurs rôles dans les processus de défense ont été démontrés pour certaines, vis-à-vis d'insectes et d'infections fongiques (Berenbaum and Zangerl, 1996).

3/ Les polyesters lipidiques : cutine et subérine

Les plantes synthétisent deux types de polyesters lipidiques : la cutine et la subérine. Leurs propriétés d'hydrophobicité leur font jouer un rôle important dans le contrôle des échanges gazeux, de l'eau et des solutés avec l'environnement. Ils constituent également une première barrière de protection contre les agents pathogènes (Pollard et al., 2008). Ils sont probablement une des clés dans la colonisation des plantes du milieu terrestre.

La structure et la composition de la cutine et la subérine sont relativement proches, cependant il existe des différences chimiques et fonctionnelles importantes. La cutine est un des constituants de la cuticule, qui est la couche protectrice externe des parties aériennes de la plante (Kolattukudy, 1980). Elle est synthétisée par l'épiderme des fruits, de feuilles, des tiges et des organes floraux (Pollard et al., 2008). Bien que la composition et la structure diffèrent d'une espèce à l'autre, des organes et du stade de développement, la cutine est principalement constituée d'acides gras hydroxylés (C16 et C18), liés entre eux par des liaisons esters et éthers. D'autres composés mineurs participent également à sa composition comme des glycérols, des diacides ou des acides hydroxycinnamiques (**fig. 14**) (Pollard et al., 2008).

La subérine est déposée au niveau de tissus externes, comme l'épiderme des racines et l'écorce, ou internes, comme l'endoderme des racines ou au niveau des zones spécifiques d'abscission et de déhiscence de la feuille, du fruit ou de la graine (Espelie et al., 1980). Sa synthèse est également induite en réponse à la blessure, et son dépôt permet de protéger les tissus sains des pathogènes (Kolattukudy, 2001).

- 22 -



Figure 15. Exemples de phénolamines identifiées chez les plantes.

La structure de la subérine est constituée d'un domaine polyaliphatique et d'un domaine polyphénolique (Bernards et al., 1995). Par rapport à la cutine, la composition du domaine aliphatique est très semblable, avec la présence d'acides gras hydroxylés et de diacides, toutefois, la subérine diffère de la cutine par sa richesse en acides hydroxycinnamiques (principalement du férulate) qui constituent le domaine polyphénolique. Une proportion importante de glycérol est également présente, qui jouerait un rôle important dans les liaisons entre acides gras et avec les phénols (**fig. 14**) (Bernards, 2002).

4/ La sporopollénine

La sporopollénine est le constituant majeur de la paroi du pollen, et est également issue du métabolisme des phénylpropanoïdes. Sa composition, sa structure et ses fonctions seront traitées dans la 3^e partie de cette introduction : le métabolisme lié au pollen.

5/ Les amides d'acides hydroxycinnamiques (phénolamides)

Les amides d'acides hydroxycinnamiques constituent un large groupe de petites molécules largement distribuées dans l'ensemble du règne végétal. Elles sont constituées d'une partie hydroxycinnamique et d'une partie phénylethylamine, comme la tyramine, ou polyamine, comme la spermidine, les deux étant liées par une liaison amide (**fig. 15**). D'une façon générale, on distingue deux types de phénolamides se basant sur leurs propriétés chimiques et physiques : les phénolamides basiques, qui possèdent une amine primaire et sont souvent solubles dans l'eau, et les phénolamides neutres, qui ne possèdent pas de fonctions fortement ionisables et sont souvent insolubles dans l'eau.

Malgré une littérature abondante décrivant la distribution et la chimie des phénolamides, leurs fonctions biologiques restent très mal connues et sujettes à controverse. On peut grossièrement distinguer les amides intervenant dans la défense de celles qui semblent jouer un rôle dans le développement des plantes.

a/ Les hydroxycinnamoyl amides dans la défense

La défense des plantes vis-à-vis des attaques microbiennes est une fonction qui a été attribuée à un certain nombre d'amides phénoliques. De façon intéressante, la différence fonctionnelle se traduit par une distinction structurale, avec l'intervention privilégiée d'amines aromatiques dans ces réponses de défense.



Figure 16. Biosynthèse des hordatines.

Les deux étapes de synthèse sont dépendantes de l'Agmatine Coumaroyl Transférase (ACT) et d'une dimérisation oxydative. L'hydroxycinnamoyl-CoA peut être du coumaroyl-CoA (R1 = H) ou du féruloyl-CoA (R1 = OMe). L'hordatine A (R1 = R2 = H) est formée si les deux précurseurs sont le coumaroyl-CoA et l'hordatine B (R1 = OMe, R2 = H) est formée si l'un des deux est le féruloyl-CoA. L'hordatine M (R2 = glycopyranosyl) est un glycoside des hordatines A ou B. D'après Burhenne et al., 2003.

1/ Les Tyramine Hydroxycinnamoyl Transférases (THT) et la feruloyl tyramine

Les dérivés hydroxycinnamoyl tyramines sont depuis longtemps associés aus réponses de défense, particulièrement chez les *Solanaceae*. La première activité Tyramine Hydroxycinnamoyl Transferase (THT) a été détectée dans les feuilles de *N. tabacum* infectées par le Virus de la Mosaïque du Tabac (Negrel and Martin, 1984). Son activité dans des cultures cellulaires ou les feuilles de différentes plantes est induite en réponse au stress mécanique (Negrel et al., 1993), aux traitements par des éliciteurs (Schmidt et al., 1998; Yu and Facchini, 1999), aux stress biotiques (Zacares et al., 2007; Negrel and Martin, 1984; Fleurence and Negrel, 1987) ou aux traitements aux UV-C (Back et al., 2001).

Les THT sont capables de synthétiser une large gamme d'amides par leur faible spécificité de substrat aussi bien pour l'amine que pour l'hydroxycinnamoyl-CoA. Toutefois, c'est préférentiellement le feruloyl-CoA et la tyramine qui sont métabolisés *in vitro*, même si des différences de spécificité sont observées entre espèces (Yu and Facchini, 1999). Les gènes correspondant ont été clonés chez la pomme de terre (Schmidt et al., 1999), le poivron (Back et al., 2001), le tabac (Farmer et al., 1999) et la tomate (Von Roepenack-Lahaye et al., 2003), tous membres de la famille des *Solanaceae*.

Les THT définissent une nouvelle famille d'acyltransférases qui semble spécifique de la famille des *Solanaceae*. Les THT présentent toutefois des similarités non négligeables avec des acyltransférases putatives d'un grand nombre d'organismes, incluant les mammifères, les levures ou les bactéries. Cette similarité est particulièrement observée avec les membres de la superfamille ubiquitaire des « GCN5-Related N-Acetyltransferases » (GNAT), et notamment les Spermidine-Spermine N-acétyltransférase (SSAT) de mammifères intervenant dans l'homéostasie du métabolisme des polyamines (Casero et al., 1991; Coleman et al., 1996). L'homologue le plus proche chez *Arabidopsis* présente une identité d'environ 40% avec les THT, cependant il a été montré qu'il ne présentait pas d'activité du type THT *in vitro* (Facchini et al., 2002).

L'hypothèse de l'implication des féruloyl tyramines dans la défense se base sur le caractère inductible de la synthèse de ces produits suite à différents stress. Negrel et *al.* (1996) ont montré que la féruloyltyramine et la féruloyloctapamine se fixaient de façon covalente sur les éléments de la paroi cellulaire, où elles feraient partie du domaine polyphénolique de la subérine (Bernards et al., 1995). Leur dépôt dans les parois pourrait constituer une barrière phénolique contre les pathogènes, et, en renforçant la paroi, diminuer sa digestibilité. Elles pourraient aussi agir comme phytoalexines en inhibant directement la croissance des hyphes fongiques, même si leur activité antifongique *in vitro* n'est pas élevée (Zacares et al., 2007).

2/ L'Agmatine Coumaroyl Transférase (ACT) et les hydroxycinnamoyl agmatines

L'Agmatine Coumaroyl Transférase (ACT) est la première amine hydroxycinnamoyl transférase à avoir été caractérisée chez les plantes (Bird and A., 1983; Bird and A., 1981). L'enzyme catalyse la synthèse d'hydroxycinnamoyl-agmatines à partir de l'agmatine et d'hydroxycinnamoyl-CoA. Les hydroxycinnamoyl agmatines sont des précurseurs directs des hordatines (**fig. 16**) qui sont des composés antifongiques très abondants dans les plantules d'orge (*Hordeum vulgare*) où ils semblent constituer un pool d'inhibiteurs fongiques préformés.

Longtemps supposées restreintes au genre *Hordeum*, les hordatines ont été décrites comme synthétisées *de novo* suite à une infection fongique dans les feuilles d'orge (von Ropenack et al., 1998; Peipp et al., 1997), mais aussi de blé (Jin and Yoshida, 2000) et semblent s'accumuler de façon générale chez les céréales après une attaque fongique (Wei et al., 1994). Burhenne et *al.* (2003) ont cloné l'*ACT* d'orge, et l'analyse de sa séquence indique qu'elle appartient à la superfamille des acyltransférases BAHD. Les comparaisons de séquences révèlent la présence d'homologues très conservés, restreints aux céréales, en accord avec la distribution des hordatines dans le règne végétal (Burhenne et al., 2003).

La fonction des hydroxycinnamoyl agmatines chez les plantes n'est pas encore parfaitement connue, mais semble être particulièrement liée à la défense antifongique via sa toxicité pour les pathogènes et/ou en participant à un renforcement pariétal (Wei et al., 1994; von Ropenack et al., 1998).

De façon surprenante, une étude récente fait état de la caractérisation d'une ACT chez *Arabidopsis* (Muroi et al., 2009). *AtACT* appartient également à la superfamille des acyltransférases BAHD, mais ne possède que 24% d'identité avec l'*HvACT* d'orge. La synthèse de coumaroyl agmatine, coumaroyl putrescine et de féruloyl putrescine, qui s'accumulent normalement dans les feuilles d'*Arabidopsis* après une infection par *Alternaria brassicicola*, est abolie chez le mutant *act*. La protéine recombinante est bien capable de synthétiser les amides attendues : elle possède une activité hydroxycinnamoyl agmatine transférase mais aussi l'activité hydroxycinnamoyl putrescine transférase. Le mutant *act* d'*Arabidopsis* est plus sensible à l'infection par *A. brassicicola*, et apporte la première preuve génétique du rôle des phénolamides dans la défense. Cependant, à la vue de la faible similarité de séquence de AtACT avec les ACT des monocotylédones, et en considérant que ces gènes sont associés à des métabolismes différents, on peut supposer qu'il ne s'agisse pas strictement d'orthologues, mais qu'une évolution convergente des gènes a abouti à des fonctions proches dans la défense.

- 25 -

3/ Les hydroxycinnamoyl-anthranilates et dérivés.

Chez l'œillet (*Dianthus caryophyllus*), l'exposition à une attaque microbienne conduit à la synthèse de phytoalexines uniques, dérivant des benzoyl-anthranilates, et appelés Dianthramides (Niemann, 1993; Yang et al., 1997). Un des gènes intervenant dans leur synthèse a été cloné par Yang et *al.* (1997), et l'enzyme correspondante montrée comme catalysant *in planta* la condensation du benzoyl-CoA et de l'anthranilate. L'Hydroxycinnamoyl/Benzoyl Transférase de l'œillet (DcHCBT) appartient à la superfamille des acyltransferases BAHD.

L'avoine (*Avena sativa*) accumule également des phytoalexines uniques en réponse à une infection, appelées Avenanthramides, et constituées de dérivés hydroxycinnamoyl anthranilates (Mayama et al., 1981). L'Hydroxycinnamoyl-CoA : hydroxyanthranilate N-hydroxycinnamoyl transférase (AvHHT) participe à leur synthèse en catalysant l'acylation de l'hydroxyanthranilate par des groupements hydroxycinnamiques. Elle appartient également à la superfamille des acyltransférases BAHD, et présente une homologie importante avec l'HCBT de l'œillet.

Les Dianthramides et les Avenanthramides sont parmi les rares phytoalexines du type phénolamides synthétisées par les plantes. L'œillet, l'avoine et quelques *Brassicaceae* font partie des plantes capables d'en synthétiser (Yang et al., 2004).

b/ Les phénolamides dans le développement

Les phénolamides impliquées dans la défense sont largement distribuées dans le règne végétal, mais sont cependant spécifiques d'espèces ou de groupes taxonomiques. Par exemple, les hydroxycinnamoyl tyramines et autres produits des THT sont spécifiques des *Solanaceae* et les hydroxycinnamoyl agmatines apparaissent spécifiques des *Poaceae*.

D'autres phénolamides ont été décrites, largement distribuées dans des familles différentes, et si leur fonction biologique reste largement inconnue, elles semblent davantage s'inscrire dans des processus développementaux.

1/ Phénolamides de la fleur

Les phénolamides ont depuis longtemps été associées à l'initiation florale et à la fertilité car elles s'accumulent principalement dans les organes floraux. Martin-Tanguy et *al.* (1978) indiquent que des phénolamides sont les composés phénoliques majeurs des fleurs de 20 espèces différentes dans de

Introduction générale

nombreuses familles de plantes. Ces amides sont principalement composées de polyamines linéaires, comme la spermidine ou la putrescine, qui peuvent être mono, di ou tri acylées par des acides hydroxycinnamiques (Martin-Tanguy et al., 1978).

Leur présence dans les organes floraux est rapportée par de nombreux travaux qui montrent que souvent les organes mâles et femelles se distinguent par leur composition en phénolamides. Par exemple, les amides basiques caféoyl putrescine et caféoyl spermidine s'accumulent majoritairement dans les organes reproducteurs femelles du tabac, alors que les amides neutres, dicoumaroylputrescine et tricoumaroyl-spermidine sont retrouvées majoritairement dans les organes mâles (Facchini et al., 2002). Des quantités similaires d'amides neutres ont été trouvées dans les anthères du maïs fertile, alors qu'elles sont absentes des anthères des plantes présentant une stérilité mâle cytoplasmique (Martin-Tanguy, 1985). De même, des amides basiques sont retrouvées dans la fleur femelle de quelques *Araceae*, et des amides neutres dans les fleurs mâles, tandis que les fleurs stériles sont dépourvues de phénolamides (Ponchet et al., 1982).

De nombreuses phénolamides ont été trouvées dans le pollen d'un nombre important d'espèces différentes. Le pollen du chêne (*Quercus dentata*) contient quatre trihydroxycinnamoyl spermidines (Bokern et al., 1995). De même, des hydroxycinnamoyl spermidines ont été trouvées chez de nombreux membres des *Rosaceae* (Strack et al., 1990) et des Fagales (*Fagaceae, Betulaceae, Coryloideae*) (Meurer et al., 1988). De façon intéressante, ces composés hydroxycinnamoyl spermidines sont retrouvés au niveau du pollen de nombreuses plantes taxonomiquement éloignées. Cette large distribution suggère un rôle physiologique conservé, donc important. Cependant il n'existe aucune preuve de leur intervention dans un processus particulier. De nombreuses fonctions hypothétiques ont été proposées, notamment dans la protection du pollen contre les UV-B, dans le stockage d'amines et de phénols rapidement mobilisables lors de la germination du pollen, ou encore comme molécule signal pour la différenciation sexuelle.

2/ Phénolamides de la graine

L'analyse métabolique des graines de quelques *Brassicaceae* a montré la présence d'hydroxycinnamoyl spermidines. Une dicoumaroyl spermidine et une feruloyl-hydroxyferuloyl spermidine ont été trouvées dans les graines de *L. annua* (S. et al., 1998) et *B. napus* (Baumert et al., 2005) respectivement. De même, une étude récente indique la présence d'une disinapoyl-spermidine et de son dérivé glycosilé dans les graines d'*Arabidopsis thaliana* (Bottcher et al., 2008; Luo et al., 2009). Le conjugué de spermidine est synthétisé par une acyltransférase du type BAHD, spécifiquement exprimée dans les graines. Encore une fois, sa fonction précise n'a pas été démontrée, mais se basant sur la capacité de l'acyltransférase de réaliser la réaction inverse efficacement, les auteurs proposent que le conjugué de spermidine constitue un stock de phénol et de spermidine, lesquels seraient mobilisés rapidement, au moment de la germination de la graine (Luo et al., 2009).





(A) Dans cet exemple, le donneur d'acyle est activé par un coenzyme A et le receveur porte un hydroxyle ou une amine pour former après transfert une liaison ester ou amide respectivement.

(B) Réaction catalysée par l'Anthranilate Hydroxycinnamoyl/Benzoyl Transférase (HCBT) de *Dianthus caryophyllus*. Dans cet exemple, le donneur d'acyle est le benzoyl-CoA et l'accepteur est l'anthranilate. Le produit résultant est le benzoylanthranilate (dianthramide B) portant une liaison amide.

2^e Partie. Les acyltransférases du type BAHD

I – Acylation enzymatique : définition et caractéristiques

L'acylation est une modification commune et biochimiquement importante pour les biosynthèses du métabolisme primaire ou secondaire. L'acylation des métabolites requiert l'intervention d'acyltransférases, largement répandues dans l'ensemble des règnes du vivant. Les acyltransférases se regroupent en familles ou superfamilles sur la base de leur structure primaire et la présence d'éléments caractéristiques. Certaines sont ubiquitaires chez les organismes vivants, tandis que d'autres sont davantage spécifiques d'un règne particulier ou d'un groupe taxonomique donné. Les plantes particulièrement, en accord avec leur remarquable diversité métabolique, comptent un nombre important de familles d'acyltransférases dont certaines leur sont spécifiques.

Chimiquement, l'acylation est une réaction de substitution. Les acyltransférases catalysent le transfert d'un groupement acyle (C_n -CO = acyle; C_2 -CO = acétyle), venant d'une molécule « donneuse d'acyle », sur une molécule dite « acceptrice d'acyle ». La réaction consiste en une substitution nucléophile par l'attaque d'un doublet d'électron libre de l'accepteur sur une liaison activée du donneur d'acyle (**fig. 17**). L'ensemble constitue une transacylation, avec l'obtention d'un dérivé de la molécule acceptrice. Le donneur d'acyle doit contenir une liaison activée, riche en énergie, venant de sa combinaison avec un bon groupe partant comme le Coenzyme A ou le glucose par exemple. L'accepteur d'acyle doit contenir un hétéroatome, le plus souvent un atome d'oxygène, d'azote ou de soufre. La transacylation aboutit ainsi à la formation d'une liaison ester, amide ou thiolester entre le donneur et l'accepteur d'acyle.

Si souvent il n'est pas observé de spécificité entre la nature de l'hétéroatome de la molécule acceptrice et sa métabolisation par une famille d'acyltransférases particulière, ça n'est pas le cas pour le groupe partant associé à la molécule donneuse. Il existe, en effet, une spécificité des familles d'acyltransférases pour la nature de la molécule activatrice. Chez les plantes, il existe quatre principaux types de molécules activatrices :

- les glucosides, formant par exemple le sinapoyl-glucose, intermédiaire dans la synthèse du sinapoyl-malate. Les acyltransférases du type « Serine Carboxypeptidase Like » (SCPL) leur sont notamment spécifiques (Milkowski and Strack, 2004).

- les « Acyl Carrier Proteins » (ACP), intervenant dans la synthèse des acides gras et des phospholipides (Cassagne et al., 1994).



Delphinidine 3-glucosyl, 5-caféoyl glucoside



(A) Réactions catalysées par la déacétylvindoline-4-O-acétyltransférase de *Catharanthus roseus* (CrDAT) {St-Pierre et al., 1998, Plant J, 14, 703-13}, (B) la Benzylalcohol Acétyltransférase de *Clarkia breweri* (CbBEAT) (Dudareva et al., 1998). (C) l'Anthocyanine Hydroxycinnamoyl Transférase de *Gentiana triflora* (GtAHCT) (Fujiwara et al., 1998)

- le quinate, formant par exemple le caféoyl-quinate (acide chlorogénique) qui sert de donneur de caféate pour la synthèse de l'acide isochlorogénique notamment (Kojima and Uritani, 1973).

- les Coenzymes A, largement majoritaires dans les réactions de transacylation, interviennent aussi bien dans le métabolisme primaire, avec l'acétyl-CoA et le cycle de Krebs par exemple, que secondaire, pour la synthèse des flavonoïdes, de la lignine ou d'alcaloïdes notamment (St-Pierre and De Luca, 2000).

La nature de la molécule activatrice est donc un premier critère définissant les familles d'acyltransférases. Cependant, même pour des enzymes utilisant un même substrat, il existe une grande diversité de structures et de masses moléculaires qui définissent différentes familles ou superfamilles d'acyltransférases. Je vais m'attacher à vous présenter l'une d'elle, la superfamille des BAHD, dont fait partie HCT ainsi que certaines enzymes que j'ai étudiées, et dont j'exposerai l'analyse plus loin.

II – La superfamille des BAHD

1/ Introduction

Le nom de cette superfamille est un acronyme constitué de la première lettre des quatre premiers membres caractérisés biochimiquement (<u>BEAT</u>, <u>AHCT</u>, <u>HCBT</u> et <u>D</u>AT). DAT et BEAT catalysent l'acétylation des précurseurs de la vindoline et du benzyl-acétate respectivement chez *Catharanthus roseus* et *Clarkia breweri* (**fig. 18**) (St-Pierre et al., 1998); (Dudareva et al., 1998), tandis que HCBT catalyse la benzoylation de l'anthranilate pour la formation d'une phytoalexine (dianthramide) chez l'œillet (**fig. 17**) (Yang et al., 1997); l'AHCT participe au transfert d'un hydroxycinnamate sur un flavonoïde (delphinidine diglucoside) chez *Gentiana triflora* (Fujiwara et al., 1998) (**fig. 18**).

D'autres gènes, appartenant à la superfamille des BAHD, avaient préalablement été identifiés se basant sur l'analyse de *glossy2* de maïs et d'*eceriferum2 (cer2)* d'*Arabidopsis*, deux mutants caractérisés par l'absence d'acides gras à très longue chaîne (C28 et C30) dans les cires épicuticulaires de la feuille (Xia et al., 1996; Tacke et al., 1995). Le clonage de *Glossy2* et *CER2* a permis de définir leur appartenance à la superfamille des BAHD au regard de leur structure, mais leur caractérisation biochimique n'a pas été réalisée, laissant ouverte la question de leur rôle catalytique dans la synthèse des cires épicuticulaires (D'Auria, 2006).





(A) structure de la Vinorine synthase (VS) de *R. serpentina*. (B) structure de l'Anthocyanine Malonyl Transférase (Dm3MaT1) de *Dendranthema x morifolium*. (C) Structure de la Vinorine Synthase, les hélices α sont représentées en orange et les feuillets β en bleu. N et C représentent les extrémités terminales de la protéine. Les résidus conservés HXXXD et DFGWG sont entourés en rouge. L'ester de CoA substrat de la réaction est représenté en noir, dans le tunnel délimité par les deux domaines.

2/ Caractéristiques structurales des BAHD

Les acyltransférases BAHD caractérisées jusqu'à présent sont monomériques, avec une masse moléculaire variant de 48 à 55 kDa. Elles sont supposées cytosoliques par l'absence de peptides de transit ou d'autres séquences d'adressage. Le niveau minimal d'identité entre les BAHD est d'environ 30% et peut atteindre plus de 90% pour les enzymes très conservées chez les plantes, comme HCT par exemple. Mais au-delà de leur similarité de séquence, d'autres éléments permettent de définir les membres de cette superfamille. C'est le cas notamment de deux séquences consensus hautement conservées à travers la famille. La première est la séquence HXXXD, située près du centre de la protéine. Ce motif est partagé avec d'autres familles d'acyltransférases utilisant des donneurs activés par le CoA, comme la chloramphénicol acétyltransférase (CAT) par exemple (St-Pierre and De Luca, 2000). Le deuxième motif est constitué de la séquence DFGWG, situé près de l'extrémité C terminale de la protéine. Des études de mutagenèse dirigée ont permis de montrer l'importance de ces motifs. La délétion ou la modification d'un ou des deux motifs aboutit à une forte réduction de l'activité de la protéine (Bayer et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Unno et al., 2007). Récemment, la structure par cristallisation a été obtenue pour deux BAHD : la Vinorine Synthase de Rauvolfia serpentina (RsVS) (Ma et al., 2005) et l'anthocyanine malonyl transférase de Dendranthema x morifolium (Dm3MaT3) (Unno et al., 2007). Ces deux BAHD sont globulaires et constituées de deux domaines de taille équivalente et reliées par une boucle. Le site actif se trouve dans un tunnel passant entre les deux domaines, et le motif consensus HXXXD s'y trouve au centre. Une des faces de l'enzyme permettrait la fixation du donneur d'acyle, tandis que l'autre fixerait l'accepteur (fig. 19). La réaction de transacylation ferait intervenir l'histidine catalytique contenue dans le motif HXXXD, laquelle déprotonerait l'hétéroatome de l'accepteur, favorisant une attaque nucléophile de l'hétéroatome sur le carbonyle de la liaison thiolester. Le second motif conservé DFGWG n'apparaît pas localisé au niveau du site actif, il semble donc davantage jouer un rôle structural que catalytique.

3/ Répartition des BAHD chez les plantes et analyse phylogénétique

La recherche des BAHD potentielles chez les organismes séquencés ou dans les banques d'ADNc ou d' « Expressed Sequence Tag » (EST), montre que cette superfamille est spécifique des plantes et des champignons (St-Pierre and De Luca, 2000). Ces analyses chez les plantes ayant leur génome séquencé ont également permis de mettre en évidence la particulière représentation de ces acyltransférases. Le génome *d'Arabidopsis* compte 64 gènes prédits pour coder des BAHD (dont 9 sont déjà caractérisés), le riz possède au moins 119 gènes de BAHD putatives (D'Auria, 2006) et le peuplier en compte 94 (Yu et al., 2009).



Figure 20. Arbre phylogénétique des acyltransférases de type BAHD

L'analyse est faite sur les séquences protéiques des 52 enzymes caractérisées chez différentes espèces de plantes (en noir) et les 64 BAHD prédites d'*Arabidopsis* (en bleu). Les clades fonctionnels sont indiqués par les cercles en couleur, les cercles gris définissent de nouveaux clades

À ce jour, 53 BAHD ont déjà été caractérisées chez un nombre important d'espèces différentes (**tableau 1**). L'analyse phylogénétique de ces BAHD a permis de mettre à jour leur répartition en clades distincts. De façon intéressante, la comparaison des activités enzymatiques des membres caractérisés, associée à leur appartenance à un clade donné, révèle une certaine conservation de l'activité enzymatique. Ainsi cinq clades principaux sont définis, se basant sur les activités portées par leurs membres (**fig. 20**).

Le clade A

Les membres caractérisés du clade A interviennent, en grande majorité, dans la modification de flavonoïdes, majoritairement des anthocyanines. Sur les 17 membres caractérisés, 13 catalysent des malonylations de glucosides de flavonoïdes et 4 transfèrent des groupements hydroxycinnamoyls sur ce même type de substrats. La réaction d'acylation des flavonoïdes est donc largement majoritaire. Elle est supposée augmenter la couleur des anthocyanes dans le cas de la malonylation ou accroître leurs stabilité par l'addition d'un acide hydroxycinnamique.

Les membres de ce clade présentent un motif commun supplémentaire qui leur est spécifique (Tyr-Phe-Gly-Asn-Cys). La recherche de ce motif chez des BAHD putatives a permis la découverte d'une anthocyanine malonyle transférase de *D. variabilis* (Dv3MaT) (Suzuki et al., 2004).

À ce jour, il existe deux exceptions dans ce clade. L'enzyme NtMAT1 catalyse *in planta* la malonylation du naphtol chez le tabac, même si *in vitro* les flavonoïdes sont également substrats (Taguchi et al., 2005), et récemment, la caractérisation d'une Agmatine Coumaroyl Transférase chez *Arabidopsis* (AtACT) fait état d'une activité enzymatique inédite pour ce clade. Cette BAHD participe à la synthèse *in planta* d'hydroxycinnamoyl-agmatines et d'hydroxycinnamoyl-putrescines impliquées dans la résistance à *A. brassicicola* (Muroi et al., 2009). De façon cohérente, ces deux membres n'ont pas le motif caractéristique de ce clade parfaitement conservé.

Le clade B

La majorité des membres de ce clade acceptent une large variété d'alcools comme substrat, avec l'acétyl-CoA comme donneur d'acyle majoritaire. Le clade peut être divisé en deux sous clades, un premier sous clade incluant des BAHD impliquées dans la synthèse d'alcaloïdes comme la vindoline ou la thébaïne (St-Pierre et al., 1998; Laflamme et al., 2001), et un deuxième, composé par des BAHD participant à la synthèse d'esters volatils des fleurs et des fruits, comme RhAAT1 de *Rosa hybrida* qui produit un ester de géraniol dans la pétale de rose (Shalit et al., 2003).

Le clade C

Ce clade peut également être divisé en deux sous clades. Un premier sous clade inclut principalement des enzymes participant à la synthèse d'esters volatiles, dont des esters de benzoate

Tableau 1. Liste des noms et abréviations des acyltransférases BAHD caractérisées chez différentes espèces végétales.

Abréviation:	Nom de l'enzyme:	Espèce :
CLADE A		
AHCT:	Anthocyanin O-Hydroxycinnamoyltransférase	- G. triflora
Dv3MAT:	Malonyl-CoA :anthocyanidin 3-O-glucoside-6''-O-malonyltransférase	- D. variabilis
Sc3MaT [.]	Malonyl-CoA anthocyanidin 3-O-glucoside-6"-O-malonyltransférase	- S curentus
Dm3MAT1 et 2	Malonyl-CoA :anthocyanidin 3-O-glucoside-6''-O-malonyltransférase	- Dendranthema x morifolium
$M_{MAT1} $	Malonyl-CoA : flavonoid/nanthol glucoside acyltransférase	- N tabacum
$I n 3 M \Lambda T 1$	Malonyl CoA : flavonol 3 O glucoside 6'' O malonyltransférase	- N. Iubucum
Vh2MAT1.	Malonyl-CoA :flavonol 2 O glucoside 6 ²² O malonyltransférase	- L. purpureum V. hybrida
V = V = V = V = V = V = V = V = V = V =	Hudroxyoinnemoul CoA :anthogyanin 2 O glucoside 6'' O malonyltransfórese	- V. hydriad D frutasoons
FIJAL.	Melanul CoA controloging 5 O chaoside 6 ²² O melanultangérese	- 1. jrulescens
SSOIVIATT.	Malonyl-CoA anthocyanin 5-O-glucoside-o -O-malonyltransierase	- S. spiendens
PISMal:	Malonyl-CoA anthocyanin 5-O-glucoside-o -O-malonyltransferase	- P. Jrulescens
	Maionyl-CoA anthocyanin 5-O-glucoside-o -O-maionyltransierase	- A. Inaliana
At3A11	Hydroxycinnamoyi-CoA :anthocyanin 3-O-glucoside transferase	- A. thaliana
At3A12	Hydroxycinnamoyl-CoA :anthocyanin 3-O-glucoside transferase	- A. thaliana
MtMaTT	Isoflavone 7-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase	- M. truncatula
MtMaT2	Isoflavone 7-O-glucoside-6"-O-malonyltransférase	- M. truncatula
MtMaT3	Isoflavone 7-O-glucoside-6"-O-malonyltransférase	- M. truncatula
GmIF7MaT	Isoflavone 7-O-glucoside-6"-O-malonyltransférase	- <i>G. max</i>
AtACT	Agmatine Coumaroyl Transférase	- A. thaliana
AtEPS1	Enhanced Pseudomonas susceptibility 1 *	- A. thaliana
CLADE B		D
SalAT:	Salutaridinol 7-O-acetyltransférase	- P. somniferum
Pun1:	Pungency1 *	- C. annum
DAT:	Deacetylvindoline 4-O-acétyltransférase	- C. roseus
MAT:	Minovincinine-19-hydroxy-O-acetyltransférase	- C. roseus
VS:	Vinorine synthase	- R. serpentine
CbBEAT:	Benzylalcohol O-acétyltransférase	- C. breweri
CmAAT4:	Alcohol acyltransférase	- C. melo
RhAAT1:	Alcohol acyltransférase	- R. hybrida
SAAT:	Strawberry alcohol acyltransférase	- F. ananassa
VAAT:	Alcohol acyltransférase	- F. vesca
Ss5MaT2:	Malonyl-CoA :anthocyanin 5-O-glucoside-6''-O-malonyltransférase	- S. splendens
PhCFAT:	Coniferyl alcohol acyltransférase	- P. hybrida
CLADE C		
CHAT:	(Z)-3-hexen-1-ol O-acetyltransférase	- A. thaliana
HMT/HLT:	Tiglovl-CoA:13 alpha-hydroxymultiflorine/13 alpha-hydroxylupanine O-tiglovltransférase	- L. albus
MpAAT1:	Alcohol acyltransférase	- M. pumila
AMAT	Anthranilovi-CoA methanol acyltransférase	- V labrusca
CbBEBT:	Benzoyl-CoA:benzylalcohol O-benzoyltransférase	- C. breweri
NtBEBT	Benzoyl-CoA:benzylalcohol O-benzoyltransférase	- N tahacum
RPRT.	Benzoyl-CoA:benzylalcohol/nhenylethanol benzoyltransférase	- P hybrida
BanAAT [.]	Banana alcohol acyltransférase	- M sanientum
DBNTBT	3'-N-debenzovl-?'-deoxytaxol N-benzovltransférase	- T canadensis
RAPT.	Baccatin III O-nhénylpronanovltransférase	- T cusnidata
DRAT:	10-deacety/baccatin III-10-0-acety/ transférase	- T cuspidata
DBRT:	2 debanzovil 7.13 diacetylbaccetin III.O banzoviltransférase	T. cuspidata
	$T_{ava} A(20) 11(12) dian 5 alpha of O acatul transféraça$	- 1. cuspidata
CmAAT1 2	Alaobal apultransfóraça	- 1. cuspitulu C. malo
AISDT	Sparmiding Digingnovil Transforma	- C. meio
AtSCT	Spermidine Coumaroyl Transférase	- A. thaliana
CLADE D		
CER2.	Eceriferum2 *	- A thaliana
Glossy2:	Glossy2 *	- Z. mays
CLADE E		
ACT:	Agmatine coumaroyltransférase	- H. vulgare
HCBT:	Anthranilate N- hydroxycinnamoyl/benzoyltransférase	- D. caryophyllus
RAS:	Rosmarinic acid synthase	- C. blumei
AsHHT1:	Hydroxycinnamoyl-CoA: hydroxyanthranilate N-Hydroxycinnamoyltransférase	- A. sativa
NtHCT:	Hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate/quinate Hydroxycinnamovltransférase	- N. tabacum
AtSHT	Spermidine Hydroxycinnamoyl Transférase	- A thaliana
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	

*: nom de mutants affectés dans une acyltransférase BAHD.

Introduction générale

(benzylbenzoates). AtCHAT, par exemple, catalyse la formation d'un ester volatil des feuilles d'*Arabidopsis* en réponse au stress mécanique, en catalysant l'acétylation de l'hexène pour former différents hexylacétates (D'Auria, 2006).

Le deuxième sous clade est composé uniquement d'enzymes de plantes du genre *Taxus*, impliquées dans la synthèse de paclitaxel (taxol) (Walker and Croteau, 2000b; Walker and Croteau, 2000a; Walker et al., 2002a; Walker et al., 2002b; Walker et al., 2000; Hu et al., 2002). Avec l'HCT de pin, il s'agit des seules BAHD connues de gymnospermes.

Le clade D

Le clade D est uniquement composé de deux membres : Eceriferum2 d'*Arabidopsis* (AtCER2) et Glossy2 du maïs. Aucun des deux n'a d'activité enzymatique caractérisée, cependant les analyses biochimiques des mutants correspondants font apparaître une diminution importante des acides gras à très longues chaînes dans les cires épicuticulaires (Tacke et al., 1995; Xia et al., 1996). Leur action supposée consisterait donc à l'élongation CoA dépendante de ce type d'acides gras pour la constitution de ces cires. Une autre hypothèse, proposée par Xia et *al.* (1996) et se basant sur la localisation nucléaire observée pour CER2, lui attribuerait un rôle de régulateur transcriptionnel de gènes de la synthèse des cires.

Le clade E

Ce clade est constitué d'acyltransférases qui toutes transfèrent un acide hydroxycinnamique sur des accepteurs de nature variée, aussi bien sur des fonctions hydroxyles que amines. Ce clade apparaît donc spécifique du métabolisme des phénylpropanoïdes. Il inclut les HCT caractérisées dont l'accepteur est le shikimate ou le quinate (Hoffmann et al., 2003), ainsi que DcHCBT et AsHHT de l'œillet et l'avoine, synthétisant les phytoalexines anthramides, et dont l'accepteur est l'anthranilate ou son dérivé. L'Agmatine Coumaroyl Transférase de l'orge (HvACT) apparaît moins proche des membres de ce clade. En fonction des études, elle y est incluse ou constitue un clade à part.

L'exception du clade vient de DcHCBT qui utilise *in planta*, non pas un hydroxycinnamoyl-CoA comme accepteur, mais un benzoyl-CoA, bien qu'*in vitro* elle soit capable d'utiliser les deux, avec une préférence pour le phénylpropanoïde (Yang et al., 1997).

4/ Les BAHD chez Arabidopsis

a/ caractérisation de BAHD chez Arabidopsis

L'analyse complète du génome d'*Arabidopsis* fait apparaître la présence de 64 BAHD putatives, se basant sur leur similarité de structure et la présence des signatures caractéristiques.

AtHCT a été la première à être caractérisée chez *Arabidopsis* (Hoffmann et al., 2004; Hoffmann et al., 2003), puis la caractérisation de huit autres acyltransférases de cette superfamille a été rapportée :

- AtCHAT synthétisant des esters volatils de feuilles en réponse à un stress mécanique, appartenant au clade C (D'Auria, 2006).

- At5Mat qui catalyse la malonylation d'anthocyanines, appartenant au clade A (D'Auria et al., 2007).

- At3AT1 et At3AT2, deux enzymes proches du clade A qui transfèrent des acides hydroxycinnamiques sur des anthocyanes (Luo et al., 2007).

- AtSDT et AtSCT synthétisent la formation d'hydroxycinnamoyl spermidines, notamment dans la graine (Luo et al., 2009).

- AtSHT qui catalyse la formation de trihydroxycinnamoylspermidines du pollen et qui se regroupe avec les membres du clade E (Grienenberger et al., 2009).

- AtACT, impliquée dans la synthèse de coumaroyl agmatine et féruloyl putrescine en réponse à un stress biotique, placée dans le clade A (Muroi et al., 2009).

En plus de ces neufs membres caractérisés pour leur activité enzymatique, deux autres sont décrits par une approche génétique, se basant sur l'étude des mutants correspondants, sans que leur activité catalytique ait été décrite :

- AtCER2 impliquée dans la synthèse des cires épicuticulaires et appartenant au clade D (Tacke et al., 1995).

- AtEPS1 (Enhanced Pseudomonas Suceptibility), dont le mutant correspondant est hypersensible à la bactérie *P. syringae*, et compromis dans sa synthèse d'acide salicylique (Zheng et al., 2009).

b/ analyse phylogénétique : définition de nouveaux clades et complexification du modèle

La conservation relative observée entre les membres d'un même clade pour leurs activités enzymatiques a été mise à profit pour orienter la recherche d'activité de BAHD potentielles. Cette stratégie a été utilisée avec succès pour la caractérisation de Dv3MaT de *D. variabilis* par exemple (Suzuki et al., 2004), ou encore de AtAT1 et AtAT2 pour lesquels la sélection préalable de gènes d'*Arabidopsis* appartenant au clade A a permis de cibler des candidats puis de trouver l'activité anthocyanine hydroxycinnamoyl transférase caractéristique de ce clade pour deux nouvelles BAHD (Tohge et al., 2005; Luo et al., 2007).

Introduction générale

Les approches de génomique fonctionnelle entreprises actuellement cherchent donc à établir des relations entre les BAHD putatives d'Arabidopsis et les BAHD caractérisées, pour prédire leur intervention dans un métabolisme particulier. Un certain nombre des acyltransférases d'Arabidopsis se répartissent clairement dans les clades définis par les membres caractérisés, leur suggérant une fonction ou activité enzymatique proche de celles-ci. Cependant, de facon intéressante, les analyses bioinformatiques montrent également la formation de clades nouveaux, constitués uniquement par des BAHD potentielles d'Arabidopsis (Yu et al., 2009). Ces clades ne sont donc pas associés à une fonction ou à une activité particulière, et définissent probablement des activités originales qui n'ont pas encore été décrites. La présence de BAHD putatives d'autres espèces, comme le peuplier, dans ces mêmes clades, indique qu'il ne s'agit pas de fonctions spécifiques à Arabidopsis (Yu et al., 2009). Le modèle défini par les premiers membres est donc probablement sur le point d'évoluer vers une complexification importante, avec l'apparition de nouvelles fonctions associées à de nouveaux clades. De plus, les dernières avancées réalisées dans la caractérisation des membres BAHD d'Arabidopsis, suggèrent un niveau de complexité supérieur à l'intérieur même des clades déjà définis. AtSDT et AtSCT, les deux acyltransférases caractérisées par Luo et al. (2009) semblent appartenir au clade C, dont les deux fonctions associées sont la synthèse d'esters volatils et la synthèse du taxol. Cependant, les activités Spermidine Hydroxycinnamoyl Transférase caractérisées pour ces deux nouveaux membres sont inédites pour ce clade. Ces analyses suggèrent donc la présence d'un nouveau sous clade associé à cette nouvelle activité. Il en est de même pour AtACT récemment carcatérisé par Muroi et al. (2009) dont l'activité d'agmatine coumaroyl transférase fait figure d'exception dans son clade où tous les autres membres utilisent un flavonoïde comme substrat. Encore une fois, il peut s'agir d'un nouveau sous clade dont AtACT est pour l'instant le seul membre caractérisé, ou alors révéler les limites de la conservation fonctionnelle des BAHD liées phylogénétiquement.



Figure 21. La fleur d'Arabidopsis thaliana.

(A) fleur mature d'*Arabidopsis* avec quatre types d'organes, les sépales (s), les pétales (p), les étamines (st) et le pistil (ps). (B) fleur mature d'*Arabidopsis* avec une sépale et deux pétales retirés pour montrer l'anthère (a) et le filet de l'anthère (f). (C) image de microscopie électronique à balayage d'une fleur au stade 9 sans ses sépales pour montrer les primordiums des pétales (p) et deux anthères des étamines longues (a) D'après Ma, 2005.



Figure 22. Différenciation cellulaire des anthères chez Arabidopsis thaliana.

Coupe transversale d'anthères d'*Arabidopsis* représentant les différents stades de développement (indiqués par le nombre à gauche). La barre est de 25 µm, les stades 1 à 5, 6 et 7, 8 et 10 et le 12 seul sont à la même échelle. Ar, Archesporial ; E, épiderme ; En, endothécium ; L1, L2 et L3, couches 1, 2 et 3 ; ML, couche moyenne ; Ms, microsporocyte ; Msp, microspore ; PG, grain de pollen ; PPC, paroi cellulaire primaire ; SPC, cellule sporogène primaire ; Sm, septum ; SPC, paroi cellulaire secondaire ; St, stomium ; T, tapétum ; Tds, tétrades. D'après Ma, 2005.

3^e Partie. Métabolismes associés au développement du pollen

La reproduction sexuée chez les végétaux est caractérisée par l'alternance de deux phases, l'une diploïde, l'autre haploïde. Les individus diploïdes produisent, par réduction chromatique (meïose), des spores haploïdes ; ce sont des sporophytes. Les individus haploïdes issus des spores sont à l'origine des gamètes ; ce sont les gamétophytes. De l'union de deux gamètes, mâle et femelle, résulte, après fécondation, un zygote diploïde à l'origine d'un nouveau sporophyte. Ce processus de reproduction est qualifié de cycle haplo-diplophasique. Les premières plantes terrestres, comme les Bryophytes, sont à dominance gamétophytique contrairement aux autres embryophytes et notamment les angiospermes qui présentent une phase gamétophytique très réduite. Chez ces plantes, le gamétophyte mâle est le grain de pollen, et sa formation jusqu'à la fécondation de l'ovule représente la phase gamétophytique.

I – Développement de l'anthère et du pollen

1/ Développement de l'anthère

Il existe une grande diversité dans la morphologie des fleurs chez les Angiospermes, mais, dans la grande majorité, les étamines se retrouvent dans le périanthe de la fleur, entourant le pistil. De même, le nombre est très variable d'une espèce à l'autre allant de deux à douze étamines par fleur. Chez *Arabidopsis*, il y a 6 étamines, quatre longues et deux courtes, constituées d'un filament et d'une anthère (**fig. 21**).

Le développement de l'anthère a déjà été largement étudié, notamment chez le tabac et chez *Arabidopsis* (Goldberg et al., 1993; Koltunow et al., 1990; Sanders, 1999), et a été divisé en deux phases principales se basant sur les évènements morphologiques, cellulaires et moléculaires. Au cours de la première phase, les divisions et différentiations cellulaires conduisent à la mise en place des tissus de l'anthère. L'anthère est constituée de quatre lobes, chacun composé de différentes couches cellulaires somatiques qui entourent la loge pollinique. La loge pollinique contient les Cellule-Mères du Pollen (CMP) destinées à devenir les gamétophytes mâles. La deuxième phase consiste en l'élargissement de l'anthère, accompagné par un allongement du filet de l'étamine. Au cours de cette phase, les microspores se développent pour donner les grains de pollen matures. En fin de phase 2, les tissus de l'anthère dégénèrent, aboutissant à la libération du pollen (déhiscence).

Chez *Arabidopsis*, le développement de l'anthère a été étudié plus précisément et divisé en 14 stades, se basant sur des caractéristiques morphologiques et cellulaires (Sanders, 1999) (**fig. 22**). Les stades 1 à 8 correspondent à la phase 1 du développement de l'anthère mentionnée plus haut, les



Figure 23. Développement du gamétophyte mâle chez Arabidopsis thaliana.

Représentation schématique des différents stades morphologiques du développement du gamétophyte mâle chez *Arabidopsis*. Au cours de la microsporogénèse, les microspores subissent une division méiotique pour produire une tétrade de microspores haploïdes, libérées par la suite. Durant la microgamétogénèse, la microspore libérée subit une Mitose Pollinique I (PMI) pour produire un pollen bicellulaire avec une petite cellule générative (Germ Cell) incluse dans une grande cellule végétative (Vegetative Cell). Par la suite la cellule générative subit la Mitose Pollinique II (PMII) pour former deux gamètes mâles (Sperm Cells) identiques. D'après Borg et al., 2009.

stades 9 à 14 correspondent à la seconde phase. Au cours des stades 1 à 5, le primordium de l'anthère aboutit, par division et différentiation cellulaire, à la forme caractéristique de l'anthère. Chaque lobe est entouré des quatre couches cellulaires sporophytiques, de l'extérieur vers l'intérieur : l'épiderme, l'endothécium, la couche moyenne et le tapétum. Ces couches entourent le sac pollinique contenant les cellules mères du pollen (CMP) et présentent des fonctions différentes et spécialisées de support, de déhiscence ou de nutrition (Koltunow et al., 1990; Ma, 2005). Aux stades 6 et 7, les CMP subissent deux meïoses successives pour aboutir à la formation de quatre cellules haploïdes associées entre elles (tétrades). Les cellules gamétophytiques se dissocient entre elles et de celles du tapétum, aboutissant à la formation d'un espace cerné par le tapétum appelé locule ou loge pollinique. Les microspores se développent en grains de pollen mature durant les stades 9 à 12, et au cours des stades 10 et 11 le tapétum dégénère. Durant les stades 12 à 14 les autres couches cellulaires dégénèrent, aboutissant à la déhiscence de l'anthère et à la libération du pollen.

2/ Développement du pollen

Les grains de pollen, qui représentent la phase gamétophytique mâle chez les plantes supérieures, résultent d'un mode de développement complexe. Leur formation commence avec les Cellules Mères du Pollen (CMP) localisées dans les anthères, et se termine à l'anthèse avec la libération du pollen mature. Ces processus peuvent êtres divisés en deux phases séquentielles, caractérisées par des modifications cytologiques importantes : la microsporogénèse et la microgamétogénèse (**fig. 23**).

La microsporogénèse débute par la division meïotique des Cellules Mères du Pollen. À ce stade, les microsporocytes sont entourés d'une paroi de callose imperméable. Le rôle de cette paroi pourrait être d'isoler les cellules germinales de leur environnement sporophytique qui l'empêcherait d'établir un programme génétique haploïde (Mackenzie et al., 1967) ou encore d'éviter la fusion entres les microspores, mais sa fonction exacte reste discutée. Deux divisions meïotiques transforment les CMP en tétrades de microspores haploïdes, chacune avec son enveloppe de callose, l'ensemble étant encapsulé dans la paroi callosique de la tétrade (**fig. 23**). À ce stade, la constitution de la paroi pollinique débute avec le dépôt de primexine autour des microspores de la tétrade (Heslop-Harrison, 1963). La sécrétion de callases par le tapétum aboutit à la dégradation des parois de la tétrade et conduit à la libération des microspores haploïdes dans le locule de l'anthère. La microgametogénèse débute à ce stade avec une réorganisation cytoplasmique importante. Les petites vacuoles de la microspore fusionnent pour en donner une grande et aboutir à la polarisation d'une grande partie du cytoplasme d'un côté de la cellule, et du noyau de l'autre (Boavida et al., 2005). Cette polarisation mène à une division asymétrique, appelée Mitose Pollinique I (PMI), essentielle pour la différenciation d'une grande cellule végétative (VC) et d'une petite cellule générative (GC) à l'origine

des gamètes mâles. Le cytoplasme des deux cellules est isolé par une fine membrane de callose qui fusionne avec la paroi interne du pollen appelée intine. Ce processus aboutit à l'arrangement cellulaire unique d'une « cellule dans une cellule ». La paroi de callose est alors dégradée, permettant à la cellule générative de se détacher de l'intine et d'acquérir une position centrale dans le pollen. Les deux cellules filles issues de la PMI possèdent un profil d'expression génétique unique qui leur confère leur structure et contrôle la fonction de chacune, et la division asymétrique de la PMI est critique pour cette différentiation (Borg et al., 2009). Après la PMI, la cellule végétative nourrit la cellule génératrice en développement, et va *in fine* former le tube pollinique au moment de la germination du pollen.

Chez de nombreuses espèces, dont *Arabidopsis*, la cellule générative subit une division mitotique supplémentaire pour former deux gamètes mâles identiques, avant la libération du pollen. Cette Mitose pollinique II (PMII) aboutit à la formation d'un pollen tricellulé. Chez d'autres espèces, la PMII n'a lieu qu'après la germination du pollen sur le stigmate, pendant l'élongation du tube pollinique (pollen bicellulé). Les deux gamètes formés vont procéder à la double fécondation, du gamète femelle (oosphère) pour donner le zygote, et des noyaux polaires, à l'origine de l'albumen, le tissu de réserve triploïde.

II – Métabolismes spécifiques du pollen

1/ Biosynthèse de la paroi du pollen

a/ Influence de l'environnement sporophytique dans la biosynthèse de la paroi pollinique : participation du tapétum

Le développement du pollen a lieu à l'intérieur de l'anthère, et les tissus qui entourent la loge pollinique lui sont essentiels. Outre leurs fonctions structurales, il est depuis longtemps supposé que les tissus de l'anthère participent au développement du pollen en lui procurant une partie de ses constituants (Goldberg et al., 1993). L'importance des tissus sporophytiques adjacents a été démontrée par des expériences d'ablation moléculaire et d'analyses génétiques. Des plantes transgéniques exprimant une RNase sous le contrôle d'un promoteur spécifique du tapétum, permet la destruction sélective de ce tissu. Chez ces plantes, le développement du pollen est largement défectueux, indiquant le rôle essentiel du tapétum dans ce processus (Goldberg et al., 1995).

De même, chez *Arabidopsis* différents gènes sporophytiques impliqués dans la fertilité mâle ont été isolés (Chaudhury, 1993). Les gènes correspondants, *MS1*, *AMS*, *AtMYB103* notamment, sont spécifiquement exprimés dans le tapétum. Sitôt après la libération des microspores dans le locule, les cellules du tapétum présentent des anomalies morphologiques, puis dégénèrent, tout comme les microspores, chez les mutants affectés dans un de ces gènes (Ma, 2005; Higginson et al., 2003; Ito and



Figure 24. Taille et morphologie de pollens de différentes espèces

Le pollen est observé en microscopie électronique à balayage (A) pollen de *Lilium auratum* (Liliaceae) ; (B) et (C) pollen de *Sildalcea malviflora* (Malvaceae) ; (D) *Helianthus annuus* (Asteraceae) ; (E) Pollen de *Oenothera fruticosa* (Onagraceae) ; (F) pollen de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) ; (G) pollen de *Ipomea purpurea* (Convolvulaceae) ; (H) pollen de *Hibiscus schizopetalus* (Malvaceae). Barre = $50 \mu m$. Source : http://remf.dartmouth.edu/images/botanicalPollenSEM

Shinozaki, 2002; Sorensen et al., 2003; Wilson et al., 2001). Ces trois gènes particuliers codent pour des régulateurs transcriptionnels putatifs, supposés contrôler certains gènes essentiels pour la structure et/ou la fonction du tapétum.

En plus de sa contribution centrale dans la synthèse de la paroi du pollen, le tapétum est également impliqué dans la production de la couche majoritairement lipidique recouvrant la paroi, et appelée manteau pollinique, pollenkit ou tryphine chez les *Brassicaceae*. Le manteau pollinique est important dans l'interaction du pollen avec le stigmate, et particulièrement avec les déterminants femelles du système d'auto-incompatibilité (Doughty et al., 1998), mais participe aussi à la réhydratation du pollen au moment de sa germination (Preuss et al., 1993). Dans l'ensemble, le manteau pollinique est issu du tapétum par des processus actifs : de nombreuses oléosines constitutives *in fine* du manteau sont spécifiquement exprimées dans le tapétum de *Brassica* ou *Arabidopsis* (Ross and Murphy, 1996; Mayfield and Preuss, 2000). Des dépôts sont également issus de la dégénérescence du tapétum suite à sa mort cellulaire programmée. En fin de développement du pollen, le tapétum dégénère et relargue des matériaux se déposant à la surface du pollen.

b/ Cinétique de formation de la paroi pollinique

La formation de la paroi pollinique débute tôt après les meïoses et continue pendant le stade tétrade et de la microspore vacuolisée, pour finir quasiment avant la première mitose pollinique (PMI). La paroi du pollen des Angiospermes consiste en différentes couches chimiquement très différentes : l'exine, la couche la plus externe, subdivisée en deux sous-couches, la nexine et la sexine et la couche interne définissant l'intine (**fig. 26**). Cependant, la mise en place de l'exine ne constitue pas uniquement des couches, mais aussi le développement d'apertures (ou pores germinatifs) et de lacunes dont le patron est caractéristique d'une espèce, comme la forme générale du pollen. La variété des tailles, des formes et des patrons de dépôt d'exine est tellement grande (**fig. 24**) et spécifique que ces critères sont pris en compte pour la détermination taxonomique des plantes.

La synthèse de l'intine commence après la libération des microspores, sous un contrôle gamétophytique supposé. La synthèse de l'exine débute dès le stade tétrade par la formation d'une matrice cellulosique appelée primexine, qui s'accumule en couche homogène entre la membrane plasmique et la paroi de callose, à l'exception du futur site des apertures. Cette primexine est synthétisée et excrétée par la microspore à la surface du pollen et définit le patron d'assemblage de la future exine (Boavida et al., 2005). Le dépôt de sporopollénine (le polymère majeur de l'exine) débute à ce stade sous forme de protrusion dans la partie distale de la paroi de callose de chaque tétrade (**fig. 25**). Sitôt après la libération des microspores dans le locule de l'anthère, la nexine I apparaît à l'extérieur de la membrane plasmique (**fig. 25**). Les bacula en développement s'appuient sur la nexine


Figure 25. Développement de l'exine du pollen d'Arabidopsis sauvage.

Microscopie électronique à transmission des coupes de pollen d'*Arabidopsis* sauvage (écotype *Ler*) en développement. Les images du haut (A, C, E, G, I) sont à un agrandissement identique (barre = 10 μ m) comme celles du bas (B, D, F, H, J) (barre = 0,5 μ m). (A,B) Cellules mères du pollen entourées par une paroi secondaire. (C, D) Tétrades. La primexine apparaît entre la membrane plasmique et la paroi de callose (astérisques). Les probacula sont visibles à ce stade (flèches), avec des dépôts de sporopollénine plus denses dans la partie distale du probaculum. (E, F) Microspores au stade unicellulaire précoce. Les débuts des tecta, bacula et nexine I sont visibles. La primexine persiste dans les cavités (astérisques). (G, H) Microspores au stade unicellulaire tardif. La formation de la sexine est quasiment terminée. (I, J) Pollen tricellulaire mature. La nexine II et l'intine sont formées. Ba, baculum ; CW, paroi de callose ; In, intine ; Lo, locule ; M, microspore ; Ne I, nexine I ; Ne II, nexine II ; PC, manteau pollinique ; PM, membrane plasmique ; PMC, cellule mère du pollen ; SP, sporopollénine ; SW, paroi secondaire ; T, tapétum ; Td, tétrades ; Te, tectum. D'après Suzuki et al., 2008.



Figure 26. Schéma et développement de la paroi pollinique.

(A) Schéma des principales caractéristiques structurales de la paroi d'un grain de pollen mature. La terminologie est en accord avec Erdtman, 1969. D'après Scott et al., 2004.

I. À ce stade ils sont approximativement à la moitié de leur taille finale. L'exine continue de se déposer, les bacula croissent tangentiellement et forment les tecta (**fig. 25**). Du matériel fibreux est visible à ce stade, qui est supposé être constitué de précurseurs de la sporopollénine venant du tapétum pour former l'exine (Paxson-Sowders, 1997; Makaroff, 1995). La primexine disparaît avant le stade tricellulaire, puis la nexine II apparaît entre la membrane plasmique et la nexine I. En conséquence de l'élargissement du pollen dans les derniers stades du développement, les lacunes de l'exine augmentent et son épaisseur diminue (Suzuki et al., 2008). Aux derniers stades, l'intine apparaît entre la membrane plasmique est déposé dans les cavités de l'exine (**fig. 25**).

c/ Constitution chimique et distribution de l'exine

Les précurseurs de l'exine sont synthétisés par les cellules du tapétum puis polymérisés sur le microspore après la séparation des tétrades. Le polymère majeur de l'exine est la sporopollénine. Elle a d'abord été identifiée dans la paroi externe des spores des mousses et des bactéries et nommée sporine, tandis que celle se trouvant dans la paroi du pollen fut nommée pollénine. Par la suite, sporine et pollénine s'avérant identique furent regroupées sous le terme de sporopollénine.

La sporopollénine confère à l'exine une résistance physique, chimique et biologique remarquable. C'est à ce jour le biopolymère le plus résistant connu, et cette caractéristique à largement contribué à freiner les avancées sur la connaissance de sa composition et sa structure par des techniques de dégradation ménagée. Une littérature abondante décrit cependant les approches entreprises par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Ahlers et al., 2003; Ahlers et al., 1999), chromatographie gazeuse à thermochemolyse (pyGC-MS) (Rozema et al., 2001; Rozema et al., 2009) ou Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FITR) (Watson et al., 2007; Dominguez et al., 1999), sur différents pollens ou spores pour élucider leur structure. Aucune de ces techniques n'a cependant clairement établi la structure ou la composition de la sporopollénine. D'une façon générale, seuls les éléments de base, capables de résister aux traitements, ont pu être analysés. L'ensemble de ces études indique cependant que la sporopollénine est principalement un polymère aliphatique associé à des phénols hydroxylés. Sa composition se rapprocherait davantage de celle de la subérine que de la lignine ou la cutine par exemple.

La sporopollénine est remarquablement distribuée ; on en trouve dans les parois du pollen des spermaphytes, dans les spores des mousses, des fougères et des bactéries (Dominguez et al., 1999). Un polymère proche de la sporopollénine a été trouvé dans les spores de quelques algues vertes (Delwiche et al., 1989). La sporopollénine est donc ubiquitaire chez les plantes terrestres et semble être apparue

juste avant la colonisation des milieux secs. Sa conservation chimique au cours de l'évolution est remarquable, suggérant un rôle central de ce polymère dans la reproduction des plantes terrestres.

d/ Constitution chimique et fonctions du manteau pollinique

En plus de la protection mécanique apportée par l'exine, une couche principalement lipidique, nommée manteau pollinique, est déposée dans les cavités de l'exine. Le manteau assumerait différents rôles physiologiques ou écologiques, comme l'adhésion du pollen aux pollinisateurs, l'interaction avec le stigma et l'auto incompatibilité, la protection contre la déshydratation, les rayons UV ou les attaques pathogéniques (Zinkl et al., 1999; Dickinson, 2000).

Contrairement à l'exine, le manteau pollinique est facilement extractible par des solvants organiques, comme le cyclohexane par exemple (Doughty et al., 1993). De ce fait, il a été extensivement caractérisé, notamment chez Brassica et Arabidopsis (Doughty et al., 1993; Preuss et al., 1993; Ross and Murphy, 1996; Murphy and Ross, 1998; Ruiter et al., 1997a; Ruiter et al., 1997b; Mayfield et al., 2001; Mayfield and Preuss, 2000; Fiebig et al., 2004). Le manteau pollinique est chimiquement séparé en une partie lipidique et en une partie protéique. Sa partie lipidique est constituée principalement d'acides gras à longues chaînes et très longues chaînes et d'esters non polaires. La partie protéique est principalement composée de glycoprotéines et petites protéines comme les oléosines. (Preuss et al., 1993; Piffanelli et al., 1997). La fonction des esters non polaires, comme les triterpènes ou des esters de stérols, serait de maintenir une fluidité et une cohésion des différents constituants du manteau. Les acides gras seraient importants au cours de l'interaction du pollen avec le stigma, étant à la fois des molécules signal et/ou stabilisatrices/solubilatrices d'autres éléments intervenant dans ce processus (Pruitt et al., 2000). Le pollen de plusieurs mutants eceriferum (cer) d'Arabidopsis affectés dans la synthèse des acides gras à très longue chaîne n'initie pas les processus d'hydratation lorsqu'il est placé sur le stigma, mais est capable de germer normalement in vitro (Preuss et al., 1993).

Les protéines majoritaires retrouvées dans le manteau sont des endoxylanases et des β glucanases chez le maïs. Elles sont synthétisées par le tapétum et participeraient à la pénétration du tube pollinique en hydrolysant la paroi des cellules du stigma (Bih et al., 1999; Suen et al., 2003). Des « lipid transfer proteins » (LTP) sont également constitutives du manteau pollinique. Ce sont des petites protéines, solubles et basiques, connues pour favoriser le transfert des phospholipides à travers les membranes *in vitro*. Elles sont capables de fixer les acyles CoA et les acides gras et permettraient leur sécrétion et dépôt sur la paroi ou le manteau. Certaines sont fortement exprimées dans le tapétum, laissant supposer un transport de matériel lipidique du tapétum vers la microspore pour la formation de la paroi et/ou du manteau par ces protéines.

2/ Biosynthèse de la paroi du pollen : approches génomiques

Le pollen, et particulièrement sa paroi protectrice, a fait l'objet de nombreuses études approfondies. La remarquable résistance de l'exine fait de l'étude de ce biopolymère un défi particulier pour en connaître sa structure et sa composition chimique expliquant ses caractéristiques uniques. De plus, sa distribution remarquable au travers de l'ensemble des plantes terrestres suggère l'existence d'un processus métabolique commun, hautement conservé et essentiel à la reproduction sexuée des espèces. Sa composition chimique n'a pu être que partiellement appréhendée par les techniques analytiques mises en jeu ces dernières décennies, et sa structure reste largement inconnue. Ces dernières années ont cependant été marquées par les progrès réalisés dans la connaissance des génomes, et leur utilisation a permis d'associer les mécanismes moléculaires aux processus physiologiques qu'ils gouvernent, comme les synthèses métaboliques par exemple. L'approche génomique est donc la nouvelle arme dont disposent les biochimistes pour appréhender la production métabolique et les précurseurs d'une synthèse. Cette approche a déjà permis d'apporter des éléments nouveaux sur la connaissance de la synthèse de la paroi du pollen, chez Arabidopsis particulièrement, se basant notamment sur l'étude de mutants. Je rapporte ici les dernières avancées réalisées dans ce domaine, en portant une attention particulière aux gènes, régulateurs ou structuraux, semblant impliqués dans la synthèse de la sporopollénine elle même et du manteau pollinique. Ne seront donc pas traités les gènes jouant un rôle dans la synthèse/dégradation de la callose, ou dans la détermination spatiale du patron de l'exine, dont certains ont également été décrits.

a/ Caractérisation de gènes catalytiques impliqués dans la synthèse de l'exine

Différents gènes d'*Arabidopsis* ont été caractérisés pour leur implication supposée dans la synthèse de la sporopollénine. Leur activité enzymatique n'est pas toujours caractérisée, et se base souvent sur l'homologie de séquence avec des enzymes connues. Les mutants correspondants présentent souvent un phénotype de stérilité mâle, ou de fertilité réduite. C'est le cas notamment du mutant *male sterility 2 (ms2)*, dont la majorité des microspores dégénère rapidement après leur libération dans le locule. Les quelques grains de pollen formés présentent un dépôt d'exine très réduit et sensible à l'acétolyse. *MS2* est exprimé dans le tapétum, tôt après le stade tétrade. Son activité enzymatique n'est pas connue, mais la protéine correspondante présente une similarité de séquence avec une protéine de jujubier capable de réduire des acides gras en leurs alcools correspondants. MS2 pourrait donc avoir ce type d'activité pour former des lipides entrant dans la composition de l'exine (Aarts et al., 1997).





Barre 20 µm. Observations au microscope électronique à balayage de (A) pollen d'*Arabidopsis* sauvage et (C) pollen du mutant *cyp703a2*. Observation au microscope électronique à transmission de coupe de pollen d'*Arabidopsis* de (B) sauvage et (D) mutant *cyp703a2*. bc, baculum ; tc, tectum ; pc, manteau pollinique; pm, membrane plasmique. D'après Morant et al., 2007.



Figure 28. Analyses microscopiques de pollen d'Arabidopsis sauvage et cyp704b1.

Barre pour A et C = 10 μ m, barres pour C et D = 1 μ m. Observations au microscope électronique à balayage de (A) pollen d'*Arabidopsis* sauvage et (C) pollen du mutant *cyp704b1*. Observation au microscope électronique à transmission de coupe de pollen d'*Arabidopsis* de (B) sauvage et (D) mutant *cyp704b1*. pc, manteau pollinique; t, tectum; b, baculum; i, intine; P, pollen. D'après Dobritsa et al., 2009.

Le gène d'*Arabidopsis CYP703A2* a été caractérisé par Morant et *al.* (2007) se basant sur l'étude du mutant, qui présente une réduction importante de fertilité. Chez ce mutant, les microspores arrivent à maturation, mais leur observation au microscope montre une très grande réduction du dépôt de l'exine (**fig. 27**). *CYP703A2* code pour un cytochrome à P450, qui hydroxyle *in vitro* les chaînes d'acides gras de longueurs moyennes (acide laurique principalement). La fusion du promoteur à la β -glucuronidase (GUS) indique une expression du gène dans le tapétum (Morant et al., 2007). Encore une fois, la relation avec la composition de la sporopollénine n'est pas établie, mais cette enzyme semble procurer un de ses précurseurs essentiels, confirmant la nature majoritairement lipidique de la sporopollénine.

CYP704B1 est un autre cytochrome P450 d'*Arabidopsis* récemment caractérisé pour son implication dans la synthèse de l'exine. Bien que le mutant correspondant ne soit pas affecté dans sa fertilité, le pollen qu'il produit est quasiment dépourvu d'exine (**fig. 28**). L'expression du gène a également lieu dans les cellules du tapétum et *in vitro*, le produit du gène hydroxyle en *oméga* les acides gras longs, principalement les C16 et C18 (Dobritsa et al., 2009b).

L'analyse récente d'une acylCoA synthetase d'*Arabidopsis (ACOS5)* fait état de sa participation à la synthèse de l'exine. *ACOS5* est exprimée dans le tapétum à un stade précoce du développement de l'anthère. Le mutant correspondant est mâle stérile et ne produit pas de grains de pollen. La protéine recombinante est active contre un panel d'acides gras à chaîne moyenne et longue, particulièrement contre l'acide oléique (C18:1) et les acides gras hydroxylés pour former l'ester de CoA correspondant (de Azevedo Souza et al., 2009).

Le mutant d'une *Dihydroflavonol Reductase Like* (*DRL1*) d'*Arabidopsis* a été décrit par Tang et *al.* (2009) comme étant mâle stérile. L'expression du gène, déterminée par une fusion promoteur-GUS, indique une expression précoce dans le tapétum, mais également dans les tétrades et les microspores en développement. Les observations de coupes transversales d'anthères du mutant *drl1* font état d'une dégénérescence des microspores rapidement après la séparation des tétrades. L'activité enzymatique de la protéine recombinante n'a pas été caractérisée par les auteurs (Tang et al., 2009).

Récemment, un crible portant sur des mutants d'*Arabidopsis* présentant une fixation anormale sur le stigmate a abouti à l'isolement de *lap3-1* et *lap3-2* (*less adherent pollen 3*). L'analyse des grains de pollen en microscopie électronique révèle une exine plus fine que celle du sauvage, avec des anomalies dans sa structure. Le clonage positionnel démontre que *LAP3* est similaire à une strictosidine synthase, mais l'analyse précise de sa séquence indiquerait une activité différente, qui n'a pas encore été caractérisée (Dobritsa et al., 2009a).

Dans le but d'identifier des mutants présentant une exine anormale, Suzuki et *al.* (2008) ont entrepris un crible d'environ 2000 plantes ayant subi une mutagenèse EMS aléatoire, par observation des lignées M2 en microscopie électronique à balayage. Douze mutants ont été sélectionnés pour le caractère anormal de leur exine. Ces mutants, appelés *kaonashi* (*kns*) (de la traduction japonaise de «*faceless* ») ont été regroupés en quatre catégories d'après la structure de leur exine (**fig. 29**). *kns1* et



Figure 29. Phénotype et classification des mutants kaonashi.

Microscopie électronique à balayage d'un grain de pollen isolé de chaque mutant. Barre = $10\mu m$ D'après Suzuki et al., 2008.



Figure 30. Analyses microscopiques de pollen d'Arabidopsis sauvage et faceless pollen1.

Barre = 10 μ m. Observations au microscope électronique à balayage de (A) pollen d'*Arabidopsis* sauvage et (C) pollen du mutant *flp1*. Observation au microscope électronique à transmission de coupe de pollen d'*Arabidopsis* de (B) sauvage et (D) mutant *flp1*. D'après Ariizumi et al., 2003.

kns11 sont du type 1, et présentent une exine collapsée sans structure tectum et baculum caractéristiques. kns4 est du type 2 avec une réduction de la quantité d'exine. kns5, kns6, kns7, kns8, kns9 et kns10 appartient à la troisième classe qui regroupe les mutants montrant une formation anormale du tectum, enfin kns2, kns3 et kns14 sont du type 4 et montrent une distribution anormale des bacula (**fig 29**) (Suzuki et al., 2008). Si l'on s'intéresse aux gènes spécifiquement impliqués dans les processus catalytiques de la formation de l'exine, seuls les mutants du type 2 qui présentent une diminution des dépôts de l'exine semblent les définir. Cependant, le clonage du seul membre de cette classe (kns4), n'a pas encore été effectué. Son activité catalytique prédite ou démontrée n'est donc pas encore connue.

b/ Gène impliqué dans la synthèse du manteau pollinique

Contrairement aux gènes impliqués dans la synthèse de la sporopollénine, les gènes participant à la constitution du manteau pollinique présentent des phénotypes beaucoup plus subtils lorsqu'ils sont mutés. Ainsi, moins de gènes impliqués dans ces processus sont caractérisés à ce jour.

Le mutant *faceless pollen-1 (flp1*) a été sélectionné lors d'un crible génétique sur la base de sa stérilité conditionnelle, réversible dans des conditions de haute humidité (Ariizumi et al., 2003). Les observations du pollen au microscope révèlent une exine lisse, due à un excès du dépôt de tryphine (**fig. 30**). Il apparaît donc que le métabolisme du manteau est perturbé, mais l'exine est également touchée, avec une sensibilité à l'acétolyse accrue. Le clonage de *FLP1* révèle que ce gène est allélique à *CER3 (Eceriferum3*), dont la fonction dans la synthèse des cires demeure inconnue.

c/ Caractérisation de gènes régulateurs impliqués dans la synthèse de l'exine

Plusieurs gènes ont été caractérisés comme gouvernant les processus de synthèse de l'exine. Wilson et *al.* (2007), reportent la caractérisation moléculaire du gène d'*Arabidopsis MALE STERILITY1 (MS1)*, régulateur critique du développement de la microspore (Wilson et al., 2001). *MS1* est exprimé dans le tapétum, à un stade précoce du développement de l'anthère, au moment de la libération des microspores. L'accumulation de la protéine est très contrôlée dans le temps, avec une disparition rapide tôt après la libération des microspores, probablement par protéolyse ubiquitine dépendante (Yang et al., 2007). L'absence d'expression de *MS1* résulte en un changement dans la sécrétion du tapétum et une structure de l'exine anormale (**fig. 31**). Le mutant homozygote *ms1* ne produit pas de pollen viable. Des études de microarrays montrent une expression différentielle pour 260 gènes chez le mutant *ms1*, dont la plupart ont été associés à la formation de la paroi et du manteau pollinique (Yang et al., 2007). MS1 contient des motifs caractéristiques qui, en plus de sa localisation



Figure 31. Analyse microscopique de la structure de l'exine du pollen sauvage et du mutant *ms1*. (A) structure caractéristique de l'exine d'un grain de pollen sauvage d'*Arabidopsis* au stade microspore. (B) structure de l'exine du grain de pollen du mutant *ms1* au stade microspore. Te, tectum ; Ba, baculum ; MI, microspore. D'après Ito et al., 2007.



Figure 32. Modèle de composition et d'assemblage de la sporopollénine.

Les acides gras hydroxylés (en rouge), synthétisés par les cytochromes P450 seraient polymérisés avec des acides gras non hydroxylés et de phénylpropanoïdes (en noir) via des liaisons esters (carrés) ou éthers (cercles). D'après Morant et al., 2007.

nucléaire, suggèrent un rôle de régulateur transcriptionnel (Ito et al., 2007). La protéine serait donc impliquée dans l'activation ou la répression, directe ou non, de gènes biosynthétiques de la paroi et du manteau pollinique.

AtMYB103 est un facteur de transcription dont le mutant correspondant a été isolé lors d'un crible de mutagenèse EMS pour sa stérilité mâle. Chez le mutant le tapétum dégénère précocement de même que la majorité des microspores. Les rares grains de pollen formés sont complètement dépourvus d'exine. De façon intéressante, l'expression du gène catalytique *MS2* est complètement nulle chez le mutant *myb103*, indiquant un rôle régulateur positif de MYB103. De même, *MS1* n'est pas exprimé dans le mutant *myb103*, et inversement *MYB103* est surexprimé chez le mutant *ms1*, suggérant que *MYB103* agisse en amont de *MS1* dans la cascade de régulation (Zhang et al., 2007).

3/ Modèles biochimiques, métaboliques et de régulation pour la synthèse de l'exine et du manteau pollinique

a/ Constitution et structure de la sporopollénine : un modèle proposé

La structure et la composition de la sporopollénine restent largement hypothétiques, cependant, un modèle basique peut être proposé. Les analyses chimiques relèvent de façon reproductible la présence d'acides gras à longues chaînes (C16, C18) et de groupements phénylpropanoïdes (voir plus haut). Les avancées sur la caractérisation de gènes impliqués dans la synthèse de l'exine font état de la particulière importance des acides gras hydroxylés, *in-chain* ou en *oméga* (par les CYP703A2 et 704B1). Le modèle le plus adapté aux connaissances actuelles peut donc se rapprocher de celui de Morant et *al.* (2007), qui proposent une sporopollénine composée d'acides gras hydroxylés ou non, liés par des liaisons esters ou éthers entre eux ou via des groupements phénylpropanoïdes (**fig. 32**).

Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude de gènes et voies métaboliques présentant un lien fonctionnel, car associés au pollen, ou un lien phylogénétique, car les gènes étudiés font partie de la famille des acyltransférases BAHD. Cependant, pour plus de clarté, les résultats seront présentés en trois chapitres distincts, chacun incluant la discussion et les perspectives qui s'y rapportent.

Dans un premier chapitre, j'exposerai mes travaux sur des BAHD phylogénétiquement proches de HCT chez *Arabidopsis*, qui ont conduit notamment à la caractérisation de la Spermidine Hydroxycinnamoyl Transférase (SHT). Je traiterai, dans un second chapitre, de la découverte de nouveaux acteurs de la synthèse de la paroi du pollen, et des travaux ayant abouti à leur caractérisation. Dans un dernier chapitre, je décrirai l'étude de membres des acyltransférases BAHD d'*Arabidopsis*, par une approche originale, alliant la génomique à la métabolomique.

Chapitre 1

Caractérisation et analyse fonctionnelle de la Spermidine Hydroxycinnamoyl Transférase (SHT) d'*Arabidopsis thaliana*



Figure R1-1. Analyse phylogénétique des BAHD putatives d'Arabidopsis.

(A) Arbre phylogénétique incluant les acyltransférases BAHD caractérisées chez différentes espèces de plantes (en noire), et les acyltransférases BAHD prédites chez *Arabidopsis* (en bleues). Les analyses sont faites en se basant sur les séquences protéiques des acyltransférases. (B) Clade E de l'arbre phylogénétique. Deux acyltransférases putatives d'*Arabidopsis* sont présentes en plus des membres caractérisés. Les pourcentages d'identité et de similarité par rapport à AtHCT sont indiqués.

Chapitre 1. Caractérisation et analyse fonctionnelle de la Spermidine Hydroxycinnamoyl Transférase (SHT) d'*Arabidopsis thaliana*

I – Introduction

1/ Contexte de l'étude

J'ai rejoint mon laboratoire d'accueil peu après les dernières grandes avancées concernant la caractérisation fonctionnelle de l'acyltransférase HCT chez le tabac et *Arabidopsis thaliana*. Son rôle essentiel dans la physiologie de la plante, via son intervention dans la synthèse de la lignine, avait permis de mettre en valeur l'importance d'une étape biosynthétique dépendante d'une BAHD.

HCT a été la première BAHD caractérisée chez *Arabidopsis*, or les données de génomique de l'époque faisaient état de la présence de nombreuses autres BAHD, dont certaines relativement proches de HCT. Afin d'associer une fonction à ces nouvelles BAHD, et éventuellement de mettre à jour leur importance biologique, nous avons entrepris l'étude d'une sélection de BAHD putatives d'*Arabidopsis* par une approche de génétique inverse.

2/ Recherche et analyse phylogénétique des BAHD d'Arabidopsis : sélection d' « HCT-like »

La découverte et l'analyse des premières acyltransférases BAHD ont permis de déterminer leurs caractéristiques structurales et catalytiques (Cf. introduction) (St-Pierre and De Luca, 2000). En nous basant sur la similarité de séquence globale, et la présence des éléments conservés, nous avons entrepris d'établir une liste de l'ensemble des membres potentiels de cette superfamille chez *Arabidopsis thaliana*. L'analyse globale du génome a mis en évidence la présence de 64 gènes candidats. L'analyse phylogénétique de ces acyltransférases putatives d'*Arabidopsis* permet d'étudier leur distribution dans les différents clades définis par les BAHD déjà caractérisées chez des espèces végétales variées. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les membres de ces clades présentent une certaine conservation de l'activité enzymatique. Ainsi, il est possible d'orienter les recherches vers un type d'acylation particulier, sur la base d'une similarité de séquence élevée révelant des activités enzymatiques proches.

En s'appuyant sur l'expertise et l'intérêt du laboratoire pour le métabolisme des phénylpropanoïdes, nous nous sommes particulièrement intéressés au clade E, contenant HCT. Ce clade incluait cinq membres caractérisés, qui sont tous impliqués dans le transfert d'un groupement hydroxycinnamique estérifié au CoA sur des accepteurs hydroxyles ou amines variés (**fig. R1-1A, fig.**



Figure R1-2. Réactions d'acylation catalysées par les acyltransférases du clade E de la superfamille BAHD

Les acyltransférases du clade E sont: (A) l'hydroxycinnamoyl-CoA: shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransférase (HCT); (B) l'hydroxycinnamoyl-CoA: hydroxyanthranilate N-hydroxycinnamoyltransférase (HHT) d'avoine; (C) l'acide rosmarinique synthase (RAS) de *Coleus blumei*; (D) l'hydroxycinnamoyl-CoA/benzoyl-CoA: anthranilate N-hydroxycinnamoyl/ benzoyltransférase (HCBT) d'œillet et (E) l'agmatine coumaroyltransférase (ACT) d'orge.

R1-2). Le clade E apparaît donc spécifique du métabolisme des phénylpropanoïdes, sans préférence toutefois pour l'accepteur et la fonction (hydroxyle ou amine) à estérifier.

De façon intéressante, en plus de AtHCT, le clade E contient deux BAHD putatives d'*Arabidopsis* : At5g57840 (appelée HCT-like1) et At2g19070 (**fig. R1-1B**). L'alignement de leur séquence protéique révèle une identité de 41 et 37 % respectivement avec HCT d'*Arabidopsis*. Ainsi, si une activité du type HCT est peu probable pour ces deux nouveaux membres à la vue des pourcentages d'identité relativement faibles, leur appartenance au même clade suggère l'utilisation d'un substrat du type phénylpropanoïde. Cependant, la faible spécificité observée chez les membres du clade vis-à-vis de l'accepteur, rend difficile la prévision exacte de leur activité enzymatique. Nous avons donc entrepris l'analyse fonctionnelle de ces deux BAHD putatives d'*Arabidopsis* par des approches différentes : la définition de leur patron d'expression dans le temps et dans l'espace, l'évaluation des conséquences d'une perte de l'expression normale des gènes et la détermination de l'activité enzymatique de protéines recombinantes.

II – Fonction de At5g57840 : une acyltransférase proche d'HCT chez Arabidopsis.

1/ Détermination du patron d'expression de HCT-like1

a/ analyse in silico

La disponibilité de plusieurs milliers d'expériences de microarrays, traitant la grande majorité des gènes d'*Arabidopsis* pour différents organes, au cours du développement et suite à différents stress, permet d'avoir une vue relativement exhaustive de la régulation spatio-temporelle de l'expression d'un gène d'intérêt. L'utilisation de ces outils indique un niveau d'expression relativement faible pour *At5g57840*, avec une expression maximale dans les inflorescences, les racines des plantules (donnée eFP Browser, http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi), ou encore dans la paroi de la graine (testa) (données Genevestigator, www.genevestigator.com). Aucune expression différentielle suite à un stress biotique ou abiotique n'est rapportée par ces outils (Winter et al., 2007; T. et al., 2008).

b/ analyse de la fusion *pAt5g57840* :: GUS

Afin de déterminer plus précisément le profil d'expression du gène étudié, j'ai produit des plantes trangéniques exprimant le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur de *At5g57840*.



Figure R1-3. Localisation de l'expression du gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur du gène *HCTlike 1* dans les hampes florales et les inflorescences d'*Arabidopsis*. Les colorations histochimiques GUS ont été réalisées sur des hampes florales (A et B) et des

inflorescences (D et E). En comparaison de la coloration GUS observée sur des nampes notates (A et B) et des inflorescences (D et E). En comparaison de la coloration GUS observée sur des coupes transversales de hampe florale (B), une coloration de Wiesner, révélant la lignine, a été réalisée sur ce même tissu (C). Les observations ont été réalisées à la loupe binoculaire. fl: fleur, pi: pistil, pd: pédicelle, st: stigmate, p: phloème, x: xylème, fi: fibres interfasciculaires, ep: épiderme, m: moelle, c : cortex, pi : pistil, cc : cylindre central ; co : coiffe racinaire.

Les 2 kb précédant l'ATG initiateur ont été clonés en amont du gène GUS, et le clone résultant a servi à transformer *Arabidopsis*.

L'analyse de ces plantes transgéniques révèle, pour l'ensemble des lignées testées, un niveau de coloration faible résultant du gène rapporteur GUS, malgré des incubations hystochimiques longues. Ces observations suggèrent un niveau d'expression faible du gène dans les organes analysés. La coloration révèle cependant une spécificité d'expression dans la hampe florale, dans l'inflorescence et dans les racines (**fig. R1-3**). Dans la hampe florale, l'analyse de coupes transversales montre une localisation du signal plus spécifique des tissus du phloème (**fig. R1-3** A et B), et dans les inflorescences, l'expression est visible dans les pédicelles et au niveau des faisceaux conducteurs du pistil (**fig. R1-3** E et F). Au niveau des racines, la coloration est observée sur toute la longueur et quel que soit l'âge des tissus. Elle semble être restreinte au cylindre central, dans lequel se trouvent les vaisseaux conducteurs.

L'induction du gène en réponse à un stress biotique et mécanique a également été testée. Des feuilles de plantes transgéniques *pAt5g57840-GUS* ont été inoculées avec deux souches de la bactérie hémibiotrophe *Pseudomonas syringae* (virulente et avirulente) et le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea*. Ces feuilles infectées ont été récoltées puis incubées pour révéler la coloration GUS, à 0, 1h, 6h, 24h et 36h après traitement. Pour aucun des échantillons, une coloration indiquant une induction de l'expression n'a été observée (non illustré). Cette même expérience a été répétée après un dommage mécanique des feuilles avec une pince. Encore une fois, aucune coloration n'a été observée à différents temps suivant le stress, indiquant que le stress mécanique n'induit pas l'expression de *At5g57840*.

At5g57840 possède donc un patron d'expression qui semble spécifique des tissus vasculaires d'organes particuliers comme les racines, les pédicelles et plus faiblement la hampe florale, et ne semble pas induit en réponse à un stress biotique ou mécanique.

2/ Caractérisation de lignées mutantes pour HCT-like1

En complément des études du profil d'expression, et dans le but de comprendre le rôle biologique que *HCT-like1* assume dans les tissus où il est exprimé, nous avons entrepris une analyse de plantes mutantes pour ce gène. Deux lignées de mutants étaient disponibles dans les banques (SAIL_347_C06 et SALK_020512), pour lesquelles une insertion T-DNA interrompait la séquence codante dans le premier et le troisième exon respectivement (**fig. R1-4**). Nous avons obtenu les graines de ces lignées, et avons entrepris leur génotypage. En utilisant des amorces spécifiques du gène et



Figure R1-4. Représentation schématique du gène At5g57840 (HCT-like1) et positions des insertions T-DNA





Analyse par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie d'extraits protéiques bactériens. Les extraits bactériens sont induits (+IPTG) ou non induits (-IPTG). La protéine de fusion HCT-like1-GST (78 kDa) s'accumule dans les bactéries induites (+IPTG). La protéine de fusion est détectée parmi les protéines insolubles de la bactérie (culot)), mais aussi parmi les protéines solubles (surnageant). Cette dernière fraction est purifiée par chromatographie d'affinité glutathion-agarose. La protéine purifiée est éluée avec du glutathion libre, clivée à la thrombine et analysée sur gel (purification).

encadrant le site d'insertion, et un primer spécifique du T-DNA, nous avons sélectionné par PCR des plantes homozygotes pour l'insertion T-DNA.

L'analyse minutieuse des plantes mutantes au cours de leur développement n'a pas permis de révéler un phénotype associé à la mutation. La perte d'expression du gène ne semble pas provoquer des problèmes développementaux évidents.

Afin de révéler un possible chémotype, nous avons réalisé des analyses métaboliques sur ces mêmes plantes. En nous basant sur l'activité enzymatique potentielle de la protéine dans la biosynthèse des phénylpropanoïdes, nous avons extrait les phénylpropanoïdes solubles des organes où le gène est exprimé. Cependant, aucune accumulation différentielle n'a été observée entre le mutant et le contrôle sauvage, tant au niveau des extraits de racines que de hampe florale ou d'inflorescences. Le gène n'apparaît pas impliqué dans la synthèse d'un composé phénolique soluble qui s'accumule dans la plante.

3/ Obtention de la protéine recombinante et tests d'activité

La séquence codante de HCT-like1 a été clonée en fusion traductionnelle avec le gène de la GST dans un vecteur d'expression bactérien. Le vecteur obtenu a été utilisé pour transformer *E. coli BL21* et l'expression du transgène induite à l'IPTG. Après lyse cellulaire, la protéine a été purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne gluthation-agarose. Les différentes étapes de la production sont décrites dans la **figure R1-5** où les extraits protéiques sont analysés par SDS-PAGE et colorés au bleu de coomassie. Une proportion importante de la protéine se retrouvait dans les corps d'inclusion (fraction culot) mais une quantité suffisante restait soluble, nous permettant de la purifier sur colonne. Après purification et clivage de la protéine fusion avec la thrombine, nous avons obtenu une préparation suffisamment propre et concentrée pour réaliser des tests d'activité sur une série de substrats potentiels.

Dans tous les cas, un hydroxycinnamoyl-CoA a été utilisé comme donneur d'acyle, se basant sur les analyses phylogénétiques suggérant ce type de substrat. Différents accepteurs ont été testés, en présence de *p*-coumaroyl-CoA ou de féruloyl-CoA et de la protéine recombinante, puis les incubations ont été analysées par HPLC couplé à un détecteur à barrette de diodes.

Les accepteurs du type quinate et shikimate (métabolisés par HCT), ont été testés pour révéler une activité similaire à HCT, mais aucun pic correspondant à l'ester attendu n'a été détecté après incubation. HCT-like1 ne semble donc pas porter une activité du type HCT.

En nous basant sur l'utilisation d'amines comme accepteurs par certains membres du clade, des polyamines linéaires, comme la putrescine, la spermidine ou la spermine, ou des amines aromatiques, comme la tyramine et l'anthranilate, ont été testées sans succès. En considérant le patron d'expression particulier du gène dans les tissus vasculaires de certains organes, nous pouvions supposer l'intervention de HCT-likel dans la synthèse d'un monomère mineur ou particulier d'une lignine ou d'un autre polymère qu'on ne retrouverait spécifiquement qu'au niveau de ces organes. La littérature fait état de la présence d'un monomère particulier dans les racines de certaines plantes supérieures, et notamment des membres de la famille des *Brassicaceae*. Ce monomère est constitué d'un acide gras estérifié à un acide hydroxycinnamique, via une fonction hydroxyl en *omega*, et dont la synthèse ferait intervenir une acyltransférase CoA dépendante (Lotfy et al., 1995). Pour tester ce type d'activité avec HCT-like1, du coumaroyl-CoA ou du sinapoyl-CoA et un acide16-hydroxypalmitique ont été incubés en présence de la protéine. Cependant, cette incubation n'a pas abouti à la formation d'un nouveau composé par HCT like1. Dans cette même idée, des alcools hydroxycinnamiques ont été testés comme accepteurs (alcool sinapylique et coniférylique) avec un hydroxycinnamoyl-CoA (*p*-coumaroyl-CoA) ou le benzoyl-CoA comme donneur, sans toutefois révéler ce type d'activité.

L'activité de HCT-like1 n'a pas été mise à jour par ces travaux, cependant l'utilisation de différents hydroxycinnamoyl-CoA dans les incubations aboutissait systématiquement à la libération de l'acide correspondant, révélant une activité thiolesterase de l'enzyme. Ce type d'activité aspécifique est courante dans le cas où le bon donneur est présent et en absence du bon accepteur. Ces résultats suggèrent donc, en plus des analyses phylogénétiques, l'utilisation probable de ce type de donneur d'acyle par HCT-like1.

III – Caractérisation de la Spermidine Hydroxycinnamoyl Transférase (SHT)

Dans le clade E spécifique des phénylpropanoïdes se trouve le gène At2g19070, codant pour une autre acyltransférase putative d'*Arabidopsis*, et présentant 37% d'identité avec HCT. Nous avons également entrepris l'analyse de cette BAHD, en utilisant la même stratégie que pour HCT-like1. Ainsi, son patron d'expression a été déterminé par fusion du promoteur à la β -glucuronidase (GUS), les conséquences d'un silencing pour le gène, ou de la perte d'expression fonctionnelle chez un mutant ont été analysées. Finalement, l'activité de la protéine recombinante a été caractérisée. L'ensemble de ces résultats ont abouti à la détermination d'un rôle original d'une nouvelle BAHD d'*Arabidopsis* dans le développement du pollen, et a fait l'objet d'une publication.

Grienenberger E, Besseau S, Geoffroy P, Debayle D, Heintz D, Lapierre C, Pollet B, Heitz T, and Legrand M.

A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *Plant Journal* (2009) 58(2):246-59.

The Plant Journal (2009)

A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of Arabidopsis anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines

Etienne Grienenberger¹, Sébastien Besseau^{1,†}, Pierrette Geoffroy¹, Delphine Debayle², Dimitri Heintz², Catherine Lapierre³, Brigitte Pollet³, Thierry Heitz¹ and Michel Legrand^{1,*}

¹Institut de Biologie Moléculaire des plantes, Unité Propre de Recherche 2357 du Centre National de la Recherche Scientifique conventionnée à l'Université Louis Pasteur, 67084 Strasbourg Cedex, France, ²Plate-Forme d'Analyses Métaboliques de l'IBMP, Institut de Botanique, 67084 Strasbourg Cedex, France, and ³UMR206 Chimie Biologique, AgroParisTech, INRA, 78850 Thiverval-Grignon, France

Received 24 September 2008; revised 1 December 2008; accepted 2 December 2008.

*For correspondence (fax +33 388 614442; e-mail michel.legrand@ibmp-ulp.u-strasbg.fr).
*Present address: Viikki Biocenter, Department of Biological and Environmental Sciences, Viikinkaari 5D, PO Box 56, Helsinki, Finland.

Summary

BAHD acyltransferases catalyze the acylation of many plant secondary metabolites. We characterized the function of At2g19070, a member of the BAHD gene family of Arabidopsis thaliana. The acyltransferase gene was shown to be specifically expressed in anther tapetum cells in the early stages of flower development. The impact of gene repression was studied in RNAi plants and in a knockout (KO) mutant line. Immunoblotting with a specific antiserum raised against the recombinant protein was used to evaluate the accumulation of At2g19070 gene product in flowers of various Arabidopsis genotypes including the KO and RNAi lines, the male sterile mutant ms1 and transformants overexpressing the acyltransferase gene. Metabolic profiling of flower bud tissues from these genetic backgrounds demonstrated a positive correlation between the accumulation of acyltransferase protein and the quantities of metabolites that were putatively identified by tandem mass spectrometry as N^1, N^5, N^{10} -trihydroxyferuloyl spermidine and N^1, N^5 -dihydroxyferuloyl- N^{10} -sinapoyl spermidine. These products, deposited in pollen coat, can be readily extracted by pollen wash and were shown to be responsible for pollen autofluorescence. The activity of the recombinant enzyme produced in bacteria was assayed with various hydroxycinnamoyl-CoA esters and polyamines as donor and acceptor substrates, respectively. Feruloyl-CoA and spermidine proved the best substrates, and the enzyme has therefore been named spermidine hydroxycinnamoyl transferase (SHT). A methyltransferase gene (At1g67990) which co-regulated with SHT during flower development, was shown to be involved in the O-methylation of spermidine conjugates by analyzing the consequences of its repression in RNAi plants and by characterizing the methylation activity of the recombinant enzyme.

Keywords: *Arabidopsis thaliana,* BAHD acyltransferases, *O*-methyltransferases, pollen coat, phenylpropanoid pathway, hydroxycinnamoyl spermidines.

Introduction

Acylation is a common and biochemically important modification of numerous plant metabolites. Plant BAHD acyltransferases were recently identified and demonstrated to share phylogenetic relationships. The BAHD family was named according to the first letter of the first four characterized members of the family (BEAT, AHCT, HCBT, DAT) (St-Pierre *et al.*, 1998; St-Pierre and De Luca, 2000). BAHD acyltransferases catalyze the transfer of the acyl moiety to a wide range of acceptor molecules and are, therefore, involved in the biosynthesis of a large array of natural plant compounds such as lignin, phenolics, alkaloids, phytoalexins, anthocyanins and volatile esters (St-Pierre and De Luca, 2000; D'Auria, 2006). Over 50 BAHD acyltransferases have been assigned a function in numerous plant species,

2 Etienne Grienenberger et al.

including dicotyledon and monocotyledon angiosperms and coniferous gymnosperms, on the basis of genetic and/or biochemical experiments (D'Auria, 2006).

We previously biochemically characterized the first identified BAHD acyltransferase of Arabidopsis thaliana as the hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transferase (HCT), which is involved in lignin synthesis. Hydroxycinnamoyl transferase was shown to catalyze the synthesis of shikimate and guinate esters of p-coumaric acid; these are the substrates of the 3-hydroxylase CYP98A3 (Schoch et al., 2001) and the precursors of guaiacyl and syringyl units of lignin. Repression of HCT resulted in marked changes in the amount and composition of lignin, thus demonstrating that HCT functions in phenylpropanoid metabolism in planta (Hoffmann et al., 2004; Besseau et al., 2007). Hydroxycinnamoyl transferase homologs have been identified in several plant species (Tsai et al., 2006; Wagner et al., 2007), consistent with the presence of lignin in all vascular plants.

Since the discovery of HCT, four other genes of A. thaliana have been biochemically demonstrated to encode BAHD acyltransferases. Three of these have been shown to acylate anthocyanin substrates (At3g29590, At1g03940 and At1g03495) (D'Auria et al., 2007b; Luo et al., 2007) and the fourth (At3g03480) to catalyze the synthesis of a volatile ester induced in leaves upon wounding (D'Auria et al., 2007a). All the BAHD acyltransferases use CoA esters as acyl donors and catalyzse either aromatic or aliphatic acylation of a variety of oxygen- and nitrogen-containing acceptors to produce esters and amides, respectively (D'Auria, 2006). This catalytic versatility makes functional predictions difficult to infer from the primary sequence alone. However, phylogenetic analysis of members of the BAHD family demonstrated that acyltransferase sequences are distributed into distinct clades, whose members display some similarity in their substrate preferences. This is the case, for instance, for acyltransferases that have anthocyanins as acceptor substrates and define a superclade of proteins (Luo et al., 2007). Hydroxycinnamoyl transferase (At5g48930) belongs to a distinct clade that also includes two other Arabidopsis members (At5g57840 and At2g19070). Several enzymes of this clade have been biochemically characterized from various plant species and shown to transfer an aromatic acyl group to various acceptors (Yang et al., 1997; Hoffmann et al., 2003; Niggeweg et al., 2004; D'Auria, 2006). Such similarity in the catalytic properties of closely related members of the BAHD family constitutes a valuable lead in the search for functions of unknown acyltransferase genes.

Here we report on the functional characterization of a BAHD acyltransferase of *A. thaliana* (At2g19070), which is phylogenetically closely related to HCT. Analysis of promoter–GUS gene fusion in transgenic Arabidopsis showed that the acyltransferase gene is specifically expressed in anther tissues at early stages of flower development.

Histochemical sections of transgenic flower buds revealed that gene expression was restricted to tapetum cells of the anthers. The analysis of metabolic profiles obtained from flower buds of RNAi plants showed the specific decrease of peaks that were putatively identified by mass spectrometry as N^1, N^5, N^{10} -trihydroxyferuloyl spermidine and N^1, N^5 dihydroxyferuloyl- N^{10} -sinapoyl spermidine. These compounds were undetectable in a T-DNA insertion mutant line, thus confirming the involvement of the acyltransferase in their biosynthesis. Expression of At2g19070 in Escherichia coli enabled us to produce a recombinant protein that displayed acyltransferase activity. Spermidine was shown to be the only acceptor substrate and various hydroxycinnamoyl-CoA esters were efficient acyl donors. Therefore, the enzyme was named spermidine hydroxycinnamoyl transferase (SHT). Another gene, a putative methyltransferase (At1g67990) that is co-regulated with SHT during anther development, was shown to be implicated in the same biosynthetic pathway by analyzing the impact of its repression in RNAi plants and by characterizing the methyltransferase activity of the recombinant enzyme expressed in bacteria.

Results

At2g19070 is specifically expressed in anthers

As mentioned above, phylogenetic studies suggested that *At2g19070* belongs to the BAHD acyltransferase gene family. Analysis of microarray data indicated a strong accumulation of *At2g19070* transcripts at early stages of Arabidopsis flower development (https://www.genevestigator. ethz.ch/gv/index.jsp; http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/ efpWeb.cgi) (Toufighi *et al.*, 2005; Winter *et al.*, 2007; Hruz *et al.*, 2008).

The kinetics of At2g19070 gene product accumulation in Arabidopsis plants were investigated using a specific polyclonal antiserum raised against the purified recombinant protein expressed in Nicotiana benthamiana leaves (see Experimental Procedures). When protein extracts of different plant organs were immunoblotted with the antiserum, At2q19070 protein was solely detected in inflorescences, more precisely in flower buds at early stages of development (Figure 1a). Flower buds of varying age were analyzed and the protein was shown to accumulate during bud growth and to disappear later on, when the flower opened (Figure 1b). To study acyltransferase gene expression at the tissue level, promoter activity pattern was investigated by analyzing GUS staining in transgenic plants expressing promoter-GUS constructs. After incubation with GUS substrate, a strong coloration appeared in closed buds at the top of inflorescences (Figure 2a,b), thus confirming the protein blot data. A close-up of stained buds revealed that GUS staining was localized to the anthers (Figure 2b). Cross



Figure 1. Expression of At2g19070 in various organs of Arabidopsis. Protein extracts from different plant tissues were separated by electrophoresis on SDS-PAGE and immunodetected with polyclonal antibodies raised against the purified recombinant protein.

(a) Expression levels in roots (R), leaves (L), stems (S) and flower buds (FB) were compared. The arrow indicates the migration of the protein at 51 kDa.
(b) Protein accumulation in flowers at the different stages of development shown in the corresponding upper photographs.

BAHD spermidine acyltransferase of Arabidopsis 3

sections of flower buds showed that the coloration was restricted to anther tapetum cell layers surrounding the microspores (Figure 2c,d). These results suggested that the putative acyltransferase participates in the highly active tapetum metabolism that provides nutrients and materials for the formation of the pollen wall and pollen coat (Piffanelli *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 2004).

Impact of At2g19070 repression and overexpression in transgenic Arabidopsis

The effects of *At2g19070* repression were studied in silenced RNAi plants and in a T-DNA tagged mutant line (Alonso *et al.*, 2003). To induce gene silencing, Arabidopsis plants were transformed with a hairpin construct containing a portion of the *At2g19070* sequence driven by the CaMV 35S promoter. Among primary transformants, silencing efficiency was checked by immunoblotting of flower extracts using the specific antiserum raised against the recombinant protein. Out of about a hundred transgenic lines analyzed, a wide range of gene expression levels was measured as shown in Figure 3(a) for selected examples, but only 5–10%



Figure 2. *At2g19070* expression analyzed by GUS staining of *At2g19070* promoter–GUS transgenic plants. (a) and (b) Global view of GUS-stained Arabidopsis inflorescences. (c) A GUS-stained section from a transgenic flower.

(d) Close-up view showing GUS staining of transgenic anther tissues (ta, tapetum cells).

© 2009 The Authors Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd, The Plant Journal, (2009), doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03773.x

4 Etienne Grienenberger et al.

of plants were strongly silenced. This might be due to the poor expression of the 35S promoter in the tapetum as observed previously (Skirycz et al., 2007). Flower buds of the most efficiently silenced plants were extracted and their HPLC profiles (Figure 4b, c) were compared with that of wildtype flower tissues (Figure 4a). Among the peaks resolved by the HPLC gradient, a majority were identified by mass spectrometry as flavonol derivatives (data not shown) and were present in similar amounts in RNAi and control extracts. In contrast, two peaks eluting at 30 and 33 min, respectively, were strongly decreased in RNAi plant extracts compared with the control profile. Mass values of 721 and 735 Da were determined from the mass of the pseudomolecular ions observed upon positive $([M+H]^+ \text{ at } m/z 722)$ and 736; Figure 4g) and negative electrospray ionization $([M-H]^{-}$ at m/z 720 and 734, not shown) of the two compounds. The mass values, retention times and UV spectra of these compounds (Table S1 in Supporting Information) strongly indicated that they are trisubstituted hydroxycinnamic acid spermidines. Such molecules have been isolated from various plant sources and their structures elucidated from ¹H-NMR, ¹³C-NMR and mass spectrometry data



Figure 3. Expression of acyltransferase protein in different Arabidopsis lines.

Protein extracts from flower buds were immunoblotted using specific antibodies raised against the recombinant protein.

(a) Expression levels in wild-type (wt) and distinct RNAi lines (lanes 1-6) were compared.

(b) Expression in knockout (KO) and *ms1* mutants compared with their respective controls.

(c) Protein accumulation in the overexpressing line (OE) compared with the wild type.

(d) Position of the T-DNA insertion in the KO mutant line.

(Meurer et al., 1988; Bokern et al., 1995; Zamble et al., 2006). Moreover, it has been shown that these compounds display characteristic fragmentation patterns of [M+H]⁺ ions when subjected to collision-induced dissociation. The fragmentation patterns of [M+H]⁺ ions from compounds 1 and 2 are shown in Figure 4(h) and are characteristic of triacylated spermidine conjugates (Meurer et al., 1988; Bokern et al., 1995; Zamble et al., 2006) (Table S1). Compound 1 yielded fragment ions at m/z 193, revealing the presence of hydroxyferuloyl residues whereas ions at m/z 193 and 207 were detected in the fragmentation pattern of compound 2, indicating the presence of both sinapoyl and hydroxyferuloyl moieties. Major ions at m/z 530 (compound 1) and 544 (compound 2) were generated by the loss of a hydroxyferuloyl moiety, and the additional loss of a second acyl moiety was likely to have yielded ions at m/z 352, 338 and 321 (Figure 4i). For the localization of hydroxycinnamoyl residues in compound 2, fragments at m/z 250 and 278 were diagnostic of the cleavage between C^4 and N^5 of the acylated spermidine molecule (see the putative fragmentation scheme presented in Figure 4i) and suggested that N^{10} is predominantly substituted by the sinapoyl residue. The minor signal at m/z 264 in the compound 2 fragmentation pattern (Figure 4h) may be explained by a fragment comprising either a sinapoyl group and the three-carbon chain or a hydroxyferuloyl group and the four-carbon chain, and thus reveals the presence of a minor isomer bearing the sinapoyl molety in the N^1 position. This heterogeneity is reminiscent of what has been described for spermidine conjugates of Quercus pollen (Bokern et al., 1995). In conclusion, mass spectrometry data enabled us to putatively identify compound 1 as N^1, N^5, N^{10} -trihydroxyferuloyl spermidine and to show that compound 2 probably includes two isomers, a predominant one N^1 , N^5 -dihydroxyferuloyl- N^{10} -sinapoyl spermidine and a minor species, N^1 -sinapoyl- N^5 , N^{10} dihydroxyferuloyl spermidine.

To confirm the function of *At2g19070 in vivo*, a T-DNA insertion mutant was analyzed (Alonso *et al.*, 2003). The mutant line (SALK_055511C) contains the T-DNA in the first exon sequence of the gene at position 91 (Figure 3d). The homozygous state of the insertion was verified by PCR (not shown) and, consistently, the protein was undetectable by immunoblotting in mutant flower buds (Figure 3b). As expected, the phenolic profiling of the KO mutant line demonstrated the complete absence of the two spermidine derivatives in bud extracts (Figure 4d).

At2g19070 was overexpressed in Arabidopsis transgenic plants under the control of the tapetum-specific TA29 promoter (Koltunow *et al.*, 1990). Gene overexpression in flower tissues was checked by immunodetection of the protein (Figure 3c). Examination of the metabolite content of transgenic flower buds (Figure 4f) revealed changes in the spermidine conjugate ratio: peak 2 was barely affected compared with wild-type (Figure 4a) but peak 1 was



Figure 4. Identification and quantification of spermidine conjugates in different Arabidopsis lines.

Flower bud HPLC profiles of wild-type (a), two RNAi lines differently repressed (b, c), a knockout (KO) mutant (d), ms1 mutant (e) and an overexpressing line (f) are presented.

(g) Peaks 1 and 2 from the wild-type profile were analyzed by positive electrospray ionization (ESI) mass spectrometry.

(h) Fragmentation patterns of [M+H]⁺ species obtained by collision-induced dissociation of compounds 1 and 2.

(i) Putative fragmentation scheme and *m/z* values of compounds 1 and 2. The scheme and *m/z* values of fragments are presented for the major compound, N^1, N^6 -dihydroxyferuloyl- N^{10} -sinapoyl spermidine (peak 2) and, when different, for N^1, N^6, N^{10} -trihydroxyferuloyl spermidine (peak 1), *m/z* values of fragments are given in brackets.

© 2009 The Authors

Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd, The Plant Journal, (2009), doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03773.x

6 Etienne Grienenberger et al.

significantly increased, indicating that methylation of the trihydroxyferuloyl precursor became a limiting step in acyltransferase overexpressing plants.

Taken together these data suggest involvement of the acyltransferase in the biosynthesis of the flower spermidine derivatives. The structure of the metabolites affected by *At2g19070* deregulation indicates that the function of the acyltransferase is likely to transfer hydroxycinnamoyl moieties on the polyamine acceptor molecule. This assumption was investigated further by assaying the activity of the recombinant enzyme produced in bacteria.

Expression of At2g19070 in Escherichia coli and substrate specificity of the recombinant acyltransferase

In order to study the enzymatic properties of the putative acyltransferase, the coding region of At2g19070 was cloned into a vector that introduced a N-terminal GST tag and then expressed in bacteria. The recombinant protein was purified by affinity chromatography and acyltransferase activity was tested with different polyamines and hydroxycinnamoyl-CoA esters as substrates. The identity of reaction products was confirmed by retention times, UV spectra and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) analysis, and relative catalytic activities with the different substrates were estimated from the relative guantities of reaction products. Spermidine was the only polyamine that appeared to be efficiently acylated, since acyltransferase activities measured with the diamine putrescine and the tetraamine spermine as acceptor substrates were only 1-3% of the value measured with spermidine. These results are in accordance with flower extract analysis that did not detect putrescine or spermine conjugates. Therefore, the acyltransferase was named spermidine hydroxycinnamoyl transferase (SHT). Several hydroxycinnamoyl-CoA esters were substrates and yielded triacylated spermidines (Figure 5). Feruloyl-CoA ester appeared to be the most efficient donor substrate, sinapoyl-CoA was a poor substrate whereas hydroxyferuloyl-CoA did not produce trihydroxyferulov spermidine. As one example, Figure 6 presents reaction product characterization after SHT incubation in the presence of feruloyl-CoA and spermidine. N^1, N^5, N^{10} -triferuloyl spermidine was the major reaction product but monoacylated and di-acylated products were also detected in smaller amounts, indicating that these intermediates were rapidly acylated further. Similar patterns of reaction products were observed after incubation with other hydroxycinnamoyl-CoA esters but with lower yields (data not shown). Spermidine hydroxycinnamoyl transferase substrate preference data may indicate that, in the biosynthetic pathway, hydroxylation and methylation steps (to form the hydroxycinnamoyl-CoA substrate) precede the transfer reaction catalyzed by SHT and that, subsequently, further hydroxylations and methylation of the intermediate amide lead to



Figure 5. Substrate preference of spermidine hydroxycinnamoyl transferase (SHT) with different CoA esters as acyl donors.

The different CoA esters shown on the left were incubated in the presence of spermidine. At the end of the incubation, reaction products were quantified by HPLC. Mean relative activity values and standard errors were calculated from duplicates.

the major flower end product, N^1 , N^5 -dihydroxyferuloyl- N^{10} sinapoyl spermidine.

Mutants affected in MS1 and SHT genes display similar chemotypes

The MALE STERILITY 1 (MS1) gene encodes a PHD-finger transcription factor that regulates pollen and tapetum development (Ito et al., 2007; Yang et al., 2007). MALE STERILITY 1 has been shown to control the expression of a set of genes associated with pollen wall and coat formation (Alves-Ferreira et al., 2007; Ito et al., 2007; Yang et al., 2007). Among these numerous genes involved in pollen development, it is worth noting that MS1 transcriptionally regulates the At2g19070 gene. Accordingly, no SHT protein accumulation could be detected by immunoprobing of ms1 flower tissue extracts with our specific antiserum (Figure 3b). Moreover, as shown in Figure 4(e), the metabolic profile of ms1 flower buds strikingly resembled that of the sht KO mutant (Figure 4d), particularly with respect to the total absence of acylated spermidines. Mass spectrometric analysis of major peaks of the profile demonstrated



Figure 6. Characterization by mass spectrometry of spermidine hydroxycinnamoyl transferase (SHT) reaction products after incubation in the presence of feruloyl-CoA and spermidine.

The incubation mixture was analyzed by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS). Positive electrospray ionization was used and $[M+H]^+$ ions with m/z of 322 (monoferuloyl spermidine), 498 (diferuloyl spermidine) and 674 (triferuloyl spermidine) were monitored after incubation in the presence (upper traces) or absence (lower traces) of recombinant SHT.

that they correspond to the same flavonoids as those present in wild-type tissues (data not shown).

Impact of SHT gene repression on pollen development

Pollen grains from wild-type and *sht* KO mutant plants were examined by light and scanning electron microscopy. Wildtype Arabidopsis pollen exhibited a characteristic shape (Edlund *et al.*, 2004; Morant *et al.*, 2007) as shown in Figure 7 (left-hand photographs). Mutant pollen wall displayed irregularities and depressions that are barely visible at low magnification using light microscopy (Figure 7d) but are clearly apparent on scanning electron micrographs (Figures 7e and 7f).

Fluorescence microscopy revealed striking changes in the autofluorescence of pollen grains of different genotypes. A strong decrease in fluorescence of KO mutant pollen (Figure 8b) was observed compared with the wild type (Figure 8a) and, in contrast, the fluorescence intensity of pollen grains of the SHT overexpressing line (Figure 8c) was

© 2009 The Authors



Figure 7. Comparison of wild-type and knockout (KO) mutant pollen grains by light and scanning electron microscopy.

Arrows indicate depressions only visible on mutant pollen. (a), (d) Control and mutant pollen examined using a stereomicroscope. (b, c, e, f) Scanning electron micrographs of wild-type and mutant pollen.

enhanced. When pollen grains were washed with agueous methanol (see Experimental Procedures), analysis of the pollen wash by HPLC demonstrated the presence of acylated spermidines as the major fluorescent compounds released from all genotypes apart from the KO mutant. Spermidine hydroxycinnamoyl transferase overexpressing pollen grains displayed increased fluorescence, probably resulting from the accumulation of trihydroxyferuloyl spermidine (Figure 8c, peak 1). It is noteworthy that the fluorescence of pollen grains of a chalcone synthase RNAi line was increased compared with wild type due to the absence of UV-absorbing flavonoids, although the quantity of spermidine conjugates was essentially unchanged (Figure 8d). Thus, altogether these results indicate that spermidine conjugates are, at least in part, responsible for pollen autofluorescence due to their outermost location in the pollen coat.

8 Etienne Grienenberger et al.



Figure 8. Spermidine conjugates of the pollen coat contribute to pollen grain autofluorescence.

Pollen grains from various genotypes were examined by epifluorescence microscopy (left-hand photographs). Pollen was washed with aqueous methanol and the metabolite content in the solvent was analyzed by HPLC. Products were detected by their fluorescence and HPLC profiles are presented on the right. Peak 1, N^1 , N^5 , N^{10} -trihydroxyferuloyl spermidine; peak 2, N^1 , N^5 -dihydroxyferuloyl- N^{10} -sinapoyl spermidine.

(a) Wild-type, (b) knockout (KO) mutant, (c) overexpressing line, (d) CHS RNAi line.

The At1g67990 O-methyltransferase gene is involved in flower spermidine conjugate biosynthesis

Among the numerous genes that are co-expressed with *SHT* in stamen tissues (http://www.genevestigator.ethz.ch/gv/index.jsp; http://bbc.botany.utoronto.ca/ntools/cgi-bin/ntools_expression_angler.cgi), one gene, annotated as encoding a putative methyltransferase (*At1g67990*), appears to be a good candidate for catalyzing the last methylation step in the biosynthesis of acylated spermidine conjugates. Therefore, we cloned the corresponding cDNA and expressed it in bacteria. The recombinant protein was found to catalyze the methylation of caffeoyl-CoA, trihydroxyferuloyl spermidine and tricaffeoyl spermidine. Methyltransferase activity with the latter compound as substrate is illustrated in Figure 9: after incubation in the presence of the enzyme, tricaffeoyl spermidine was trimethylated into triferuloyl

spermidine. Mono- and dimethylated intermediate products were also identified in the incubation medium. Moreover, the function of At1g67990 in spermidine conjugate biosynthesis in vivo was confirmed by analyzing the impact of gene repression in RNAi plants. The tapetum-specific promoter that proved efficient for SHT overexpression (Figure 3c) was used to drive the expression of a hairpin construct that contained an At1g67990 sequence (see Experimental Procedures). Profiling of flower extracts demonstrated a decrease of sinapoylated spermidine conjugate and a correlated accumulation of trihydroxyferuloyl spermidine (Figure 10). These data indicate that the O-methyltransferase is involved in the last step of the biosynthesis of N^1 , N^5 -dihydroxyferuloyl- N^{10} -sinapoyl spermidine. During the completion of this work, results showing that At1g67990 belongs to the CCoAOMT gene family and methylates various caffeic acid esters and trihydroxyferuloyl spermidine in vitro were independently obtained by another group (Fellenberg et al., 2008). In that study, At1g67990 gene repression in RNAi plants under the control of the CaMV 35S promoter resulted in changes in the relative amounts of the two spermidine



Figure 9. O-methyltransferase activity of At1g67990 protein expressed in bacteria.

Tricaffeoyl spermidine synthesized by spermidine hydroxycinnamoyl transferase (SHT) was used as the substrate. The incubation mixture was analyzed by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) and ions with *m*/*z* values of 632 (tricaffeoyl spermidine), 646 (monomethylated product), 660 (dimethylated product) and 674 (trimethylated product = triferuloyl spermidine) were monitored.

(a) Control without enzyme.

(b) Incubation in the presence of the recombinant enzyme.

© 2009 The Authors



Figure 10. Comparison of HPLC profiles obtained from flower bud extracts of

wild-type (a) and *At1g67990* RNAi line (b). Peaks 1 and 2 were identified as trihydroxyferuloyl spermidine and dihydroxferuloyl-sinapoyl spermidine, respectively, as indicated in Figure 4.

conjugates that were comparable to those we observed (Figure 10). These results unequivocally demonstrate that *At2g19070* (*SHT*) and *At1g67990* (*CCoAOMT*) are genes that are tightly co-regulated during anther development and are both implicated in the biosynthesis of spermidine conjugates of Arabidopsis pollen as illustrated in Figure 11.

Discussion

The results presented here identify *At2g19070* as encoding an acyltransferase specifically expressed in tapetum cells of the anthers (Figure 2). This specific pattern of expression has not to our knowledge been previously reported for any BAHD acyltransferase and constitutes a first clue for a function of *At2g19070* in pollen development. Moreover, in contrast to other Arabidopsis acyltransferase genes implicated in the biosynthesis of flavonoids or green leaf volatiles that are strongly induced by stress (D'Auria *et al.*, 2007a; Luo *et al.*, 2007), *At2g19070* appeared not to be responsive to stress as suggested by array data (Toufighi *et al.*, 2005; Winter *et al.*, 2007; Hruz *et al.*, 2008). This was confirmed by using promoter–GUS transgenics where no change in GUS expression was recorded when leaves were challenged with pathogens or wounded (data not shown).

Anther tissues play a crucial role in pollen development (Owen and Makaroff, 1995). The tapetum cell layers supply the materials necessary for the formation of the pollen cell wall that is built up after the release of haploid microsporocytes in the anther locule. The outer wall of the pollen grain,



Figure 11. A putative scheme of the biosynthetic steps leading to spermidine conjugates in Arabidopsis flowers.

The three acyltransferase reactions catalyzed by spermidine hydroxycinnamoyl transferase (SHT) *in vitro* are indicated. *In vitro* and *in vivo* data have demonstrated that At1g67990 is involved in the last *O*-methylation step. Other unknown methyltransferases may be involved in *O*-methylation of tricaffeoyl spermidine since this compound did not accumulate in plants silenced for At1g67990.

the exine layer, displays a high degree of mechanical resistance and is, structurally, the most complex type of plant cell wall. Sporopollenin is the major biopolymer of the exine and is actively synthesized by tapetum cells during the free microspore stage. Sporopollenin polymer consists mainly of long-chain fatty acids and phenolic compounds, the exact structure of the molecular network remaining largely unknown (Piffanelli *et al.*, 1998; Blackmore *et al.*, 2007; Morant *et al.*, 2007).

At the late stage of pollen grain development, tryphine is deposited on the surface and within the chambers of the exine and constitutes the pollen coat (Scott *et al.*, 2004; Murphy, 2006; Blackmore et al., 2007). Tryphine contains a range of lipids, glycolipids, flavonoids and proteins which are involved in pollination and pollen-stigma interactions. First, the pollen coat protects pollen from excess desiccation after anther dehiscence. Its adhesive properties allow the pollen to stick to insect vectors for dispersal and to attach to the dry surface of stigmas, where it promotes the hydration necessary for pollen germination and tube growth (Edlund et al., 2004; Murphy, 2006). Unlike the exine, the pollen coat is readily extractable by organic solvents, without altering the intracellular content of the pollen grain (Piffanelli et al., 1998; Murphy, 2006). Here we showed that acylated spermidines were easily extracted from the pollen coat by a gue ous methanol (Figure 8), and thus the outermost location of the compounds may offer the pollen grain protection against environmental stresses. For example, acylated spermidines have been reported to have antifungal activity (Walters et al., 2001) and may therefore constitute a shield against pathogen attack. The phenylpropanoid pathway is known to be particularly active in the tapetum cells of the anthers (Herdt et al., 1978; Piffanelli et al., 1998) leading, in particular, to the accumulation of flavonol derivatives. The importance of flavonols in the reproductive tissues appears to be greatly variable depending on plant species: for instance, flavonols are required for maize and petunia fertility (Mo et al., 1992) whereas they are dispensable for Arabidopsis pollen fertility (Burbulis et al., 1996). The accumulation of polyamine conjugates in the reproductive organs of plants has also been associated with fertility (Martin-Tanguy et al., 1982). A N[']-spermidine feruloyl-transferase activity has been evidenced in tobacco callus extracts but not characterized at the molecular level (Negrel et al., 1991). Hydroxycinnamic acid spermidines have been found in the pollen of various plant species (Meurer et al., 1988; Bokern et al., 1995), thus suggesting a general role for these phenylpropanoid compounds in pollen function. However, the genes involved in their biosynthesis remained unknown and genetic evidence of their function was lacking until now.

Due to their phenylpropanoid mojeties, acylated polyamines display a maximum of absorbance at a wavelength of about 320 nm and may protect plant cells from UV irradiation. A role in UV protection of leaf tissues has been previously proposed for phenolic compounds such as flavonoids and sinapoylmalate. Arabidopsis mutants that are compromised in their ability to produce flavonoids or sinapate esters have been shown to be more susceptible to UV irradiation than wild-type plants (Landry et al., 1995). We were unable to detect any increase of the sensitivity to UV for mutant pollen defective in SHT gene expression and consequently lacking triacylated spermidines. No effect of UV irradiation could be observed on pollen germination and tube growth either in vitro on synthetic medium or in vivo on the flower stigmas (data not shown). Moreover, mutant pollen fertility appeared similar to that of wild-type pollen. Thus, the biological importance of spermidine conjugates in

pollen development remains elusive even though microscopic observations have shown some defects in the mutant pollen (Figure 7).

Many genes required for the formation of the pollen wall and pollen coat have been identified (Scott et al., 2004; Blackmore et al., 2007). Male Sterility 1 (MS1) is a transcriptional regulator that is expressed in tapetum and controls a whole set of genes involved in pollen development (Alves-Ferreira et al., 2007; Ito et al., 2007; Yang et al., 2007). Among these genes, it is interesting to note that At2q19070 is transcriptionally regulated by MS1 along with genes encoding enzymes for lipid and phenylpropanoid metabolism, cytochrome P450s and pollen coat proteins. The ms1 pollen is sterile and presents severe aberrations in exine structure that have been linked to defects in the biosynthesis of sporospollenin (Ito et al., 2007; Yang et al., 2007). The ms1 mutant was also shown to display impaired pollen coat development that was thought to be due to compromised lipid synthesis (Yang et al., 2007). Here we have shown that ms1 is unable to synthesize acylated spermidine (Figure 4e), consistent with the repression of the SHT gene and the lack of accumulation of SHT protein. It is noteworthy that, in contrast to ms1, pollen deficient in acylated spermidines as a result of SHT gene knock-out is less profoundly affected in its development and is fully fertile. This suggests that ms1 pollen sterility is due to the pleiotropic effects of this mutation.

The protein encoded by At2g19070 was produced in bacteria and was demonstrated to catalyze the transfer of various hydroxycinnamoyl groups onto the three amine functions of spermidine (Figure 5). Among the different CoA esters that were tested as acyl donors, feruloyl-CoA proved the best substrate, giving rise to N^1, N^5, N^{10} -triferuloyl spermidine. Mono- and diacylated spermidines were detected in the incubation medium (Figure 6) but in lower amounts compared with triferuloyl spermidine, indicating a rapid acylation rate of the reaction product intermediates. Very low activity was measured with the diamine putrescine or the tetraamine spermine as substrates. The acyltransferase is, therefore, a spermidine hydroxycinnamoyl transferase (SHT). Metabolic profiling of Arabidopsis flowers revealed the occurrence of three spermidine conjugates, the predominant one being identified by LC/MS/MS as N^1, N^5 -dihydroxyferuloyl- N^{10} -sinapoyl spermidine. These findings indicate that, in the biosynthetic pathway of the flower products, the acyltransferase reaction is followed by three hydroxylations at the 5-position of each of the three aromatic rings and by the O-methylation of one hydroxyferuloyl moiety at the N^{10} or N^1 position of the molecule. The O-methyltransferase gene involved in the last biosynthetic step has been identified by demonstrating the impact of its repression on accumulation of spermidine conjugate in flower tissues of RNAi plants (Figure 10), and by showing the capacity of the recombinant protein to methylate acylated spermidine conjugate *in vitro* (Figure 9). Our current understanding of the biosynthesis of the compounds is summarized in Figure 11. Further work is needed to elucidate the complete biosynthetic pathway.

Experimental procedures

Plant material and culture conditions. Arabidopsis thaliana Columbia 0 (Col-0) and Landsberg *erecta* ecotypes were grown. For germination, seeds were surface sterilized and placed on MS medium (Duchefa, http://www.duchefa.com/) supplemented with 10 g L⁻¹ sucrose and 10 mg L⁻¹ phosphinotricin or kanamycin if required. After cold treatment for homogenous germination (2 days at 4°C in the dark), the seeds were exposed to 20°C and 70 μ mol m⁻² sec⁻¹ light intensity under a light/dark cycle of 12 h/ 12 h. Twelve days later, the plants were transferred to a growth chamber under a light/dark cycle of 16 h/8 h.

Production of transgenic Arabidopsis plants expressing At2g19070 promoter–GUS fusion. A 2-kb DNA fragment situated upstream of the At2g19070 coding sequence was amplified by PCR from Col-0 genomic DNA using the primers 5'-AGTGGATCCTCTGCTCACCTAACCTAGTCGACA-3' and 5'-GAG CCCGGGAACACAAACCCCCTTTCTTTTCT-3', containing BamHI and Xmal restriction sites, respectively. The PCR product was inserted in pBI101 vector (Clontech, http://www.clontech.com/) and the construct was used to transform Arabidopsis plants.

GUS staining. For histochemical staining of GUS activity, flower buds were detached and fixed in a solution containing 50 mm sodium phosphate buffer (pH 7) and 1% glutaraldehyde for 10 min. Flower buds were then vacuum infiltrated in 50 mm sodium phosphate buffer (pH 7), containing 1 mm ferrocyanide, 1 mm ferricyanide, 10 mm EDTA, 0.01% Triton X-100 and 1.5 mm X-Gluc substrate for 10 min before 6 h incubation at 37°C. After successive washes with 50%, 70% and 96% ethanol solutions, tissues were directly observed under a stereomicroscope or gradually embedded in Paraplast before transverse sections (10 μ m thick) were made with the Leica RM2155 microtome (http://www.leica.com/) and mounted on slides with Eukitt (Electron Microscopy Sciences, http:// www.emsdiasum.com/). Observations were made with a Nikon E800 microscope (http://www.nikon.com/).

Epifluorescence, light and scanning electron microscopy. For epifluorescence microscopy, pollen was deposited between a microscope slide and a cover slide in a droplet of PBS buffer, and observed with a Nikon E800 microscope using a Nikon UV-2A filter with excitation wavelength in the range 330–380 nm. A Leica Macro Fluo stereomicroscope was used for pollen observations at low magnification. For electron scanning microscopy, we used a Hitachi TM 1000 SEM (http://www.hitachi.com/) at an accelerating voltage of 1 or 2 kV, depending on the magnification.

Production of recombinant proteins and polyclonal antibodies. The full coding sequences of *At2g19070* and *At1g67990* were cloned in pGEX-KG using *Ncol/Xho*l and *Ncol/Hind*III restriction sites, respectively. The inserts were sequenced and the recombinant plasmids were used to transform *E. coli* BL21-G612. Conditions of expression of the recombinant proteins and purification by affinity chromatography were as previously described (Hoffmann *et al.*, 2003).

BAHD spermidine acyltransferase of Arabidopsis 11

The expression in N. benthamiana leaves was carried out using the pBin61 binary vector. At2g19070 coding sequence with six additional histidine codons ahead of the stop codon, was PCR amplified using 5'-AGGGATCCCATGGCTCCCATAACTTTTAGAAA-3' and 5'-GCCCCCGGGGGAATGATGATGATGATGATGATGATATCTT-CATAAAAG-3' oligonucleotides as forward and reverse primers and inserted in pBin61 BamHI and Xmal restriction sites. Conditions of expression of the recombinant protein and co-expression of a viral silencing suppressor were as previously described (Voinnet et al., 2003). Leaf tissues were ground in liquid nitrogen and extracted with 50 mm sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 500 mm NaCl and 5 mm imidazole. The recombinant protein was purified by affinity chromatography on Ni beads (HisTrap FF, Amersham Biosciences, http://www1.gelifesciences.com/) following the manufacturer's instructions and used to raise polyclonal antibodies in rabbit by the procedure described previously (Besseau et al., 2007). Anti-SHT antibodies were used at 1/10 000 dilution in protein blot experiments after overnight pre-incubation with an acetonic powder of Arabidopsis leaves to eliminate any aspecific signal.

Protein gel blot analysis. The basic procedures for the electrophoresis of proteins under denaturing conditions and immunoblotting were as described previously (Geoffroy *et al.*, 1990), except that phosphatase activity was detected with a chemiluminescent substrate (CDP-Star; Bio-Rad, http://www.bio-rad.com/).

Synthesis of CoA ester and tricaffeoyl spermidine substrates. The CoA esters were chemically prepared according to published methods (Stockigt and Zenk, 1975; Negrel and Smith, 1984). Tricaffeoyl spermidine was produced by incubating recombinant SHT with caffeoyl-CoA and spermidine, and used as substrate for the *O*-methyltransferase reaction without purification.

Enzyme activity determination. The SHT activity was measured in 50 µl 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7) containing 1 mM dithiothreitol, 2 mM polyamine substrate, 0.5 mM CoA ester and 1– 5 µg of protein. After incubation for 1 h at 30°C, the reaction was stopped by the addition of 15 µl acetonitrile and 1 µl 12 N HCI. The samples were centrifuged at 18 000 *g* for 5 min and 45 µl were analyzed by HPLC.

The *O*-methyltransferase activity was assayed with 1 mm *S*-adenosylmethionine (Adomet) and 0.5 mm CoA ester as substrates in 100 μ l 100 mm sodium phosphate buffer (pH 7) containing 1 mm dithiothreitol, 1 mm MgCl₂ and 5 μ g of protein. After incubation for 1 h at 30°C, samples were processed as described above for SHT and 30 μ l was analyzed by HPLC. For testing *O*-methyltransferase activity with tricaffeoyl spermidine as substrate, tricaffeoyl spermidine was first produced by incubating SHT with spermidine and caffeoyl-CoA in 100 μ l final volume under the conditions described above for SHT assay. At the end of SHT incubation, MgCl₂ and Adomet were added at 1 mm final concentration and the solution was incubated for an additional 30 min at 30°C in the presence of 5 μ g recombinant methyltransferase. At the end of the incubation, 2- μ l aliquots were analyzed by ultra performance (UP) LC/MS/MS.

Production of RNAi and SHT overexpressing plants The At2g19070 and At1g67990 fragments were PCR amplified from pGEX-KG plasmids containing the cognate cDNAs. The sense and antisense primer sequences were 5'-GAGTCTAGACTCGAGGTAA

© 2009 The Authors

Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd, The Plant Journal, (2009), doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03773.x

12 Etienne Grienenberger et al.

CGCCGAGGGAGTGGAA-3' and 5'-CATGGATCCGGCGCGCCTAGC TTTAAGAGCTTTCAGTTGGA-3', respectively for *SHT*, and 5'-GAG-TCTAGACTCGAGATTACCTGACAAAGGCATTCTC-3' and 5'-CTCG GATCCGGCGCGCCTGTGATCAACACCTGCTTTCTT-3', respectively for *CCoAOMT*. The resulting PCR products were inserted in pFGC5941 binary vector (http://plantsci.missouri.edu/muptcf/ pFGC5941.html) that contains a chalcone synthase intron. Gene fragments were introduced in opposite directions upstream and downstream of the intron using *Xhol–Ascl* and *BamHI–Xbal* restriction sites. For *At1g67990* silencing, the 35S promoter of the pFGC5941 was first removed using *Eco*RI and *Xhol* restriction sites and replaced, using the same restriction sites, by the TA29 promoter that had been PCR-amplified from TA29-pGREEN (kindly provided by Dr A. Skirycz, Potsdam, Germany). Gene fragments were then introduced using *Xhol–Ascl* and *BamHI–Xbal* restriction sites.

For the production of SHT overexpressers, the coding sequence of SHT was PCR amplified from flower cDNA using the following primers: 5'-GAGCCATGGCTCCCATAACTTTTAGAAAATCTTA-3' (forward), 5'-GAGGGATCCCTAGATATCTTCATAAAAGTGTTTCTTG -3' (reverse). The sequence was introduced in the pGREEN plasmid downstream of the TA29 promoter using the *Ncol* and *Bam*HI restriction sites.

Transformation of Arabidopsis (Col-0) was performed with *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain by the floral dip method (Clough and Bent, 1998) and transformants were selected from soil-grown plants by spraying 300 mg L^{-1} Basta (glufosinate) herbicide solution.

Extraction of flower metabolites. Samples (100 mg) of flower tissues were frozen in liquid nitrogen and quickly ground in 500 μ l methanol. After centrifugation at 500 *g*, the supernatant was collected and the residual pellet was re-extracted with 200 μ l of 70% methanol. The supernatants were combined, clarified at 13 000 *g* for 20 min at 4°C, and analyzed by HPLC or UPLC/MS/MS.

Analysis of flower extracts by HPLC and LC/MS/MS characterization of the metabolites. For HPLC analysis, phenolic compounds were resolved on a RP C18 column (Novapak, 4 μ m, 4.6 × 250 mm; Waters, http://www.waters.com/) using an increasing gradient of acetonitrile in water containing 0.1% formic acid. Gradient conditions at a flow rate of 1 ml min⁻¹ were as follows: 100% solvent A to 50% solvent B for 50 min; 50% solvent B to 100% solvent B for 5 min; 100% solvent B to 100% solvent A for 5 min and then 10 min re-equilibration in 100% solvent A. Solvent A contained acetonitrile/water/formic acid (10:89.9:0.1, v/v/v) and solvent B acetonitrile/water/formic acid (80:19.9:0.1, v/v/v). The UV absorption spectra of compounds were recorded with a photodiode array detector (996 detector, Waters) and fluorescence was measured with a 474 detector (Waters) set on 315 nm for excitation and 405 nm for emission.

For analysis by LC/MS/MS, an Acquity UPLC system (Waters) coupled to a Quattro Premier XE triple Quadrupole MS system (Waters Micromass) was used. Products were resolved on an Acquity UPLC BEH C18 column (2.1×100 mm, 1.7μ m) and precolumn (2.1×5 mm, 1.7μ m) at 25°C and a flow rate of 0.45 ml min⁻¹. Samples of 3 µl were injected and an increasing gradient of acetonitrile in water and containing 0.1% formic acid was used for elution. Gradient conditions were as follows: 3–20% acetonitrile for 17 min; 20–40% for 20 min; 100% for 3 min and 3% for 5 min.

The mass spectrometer was run using the Mass-Lynx software. The electrospray ionization source conditions in positive and negative modes were optimized by direct infusion of kaempferol-3glucoside and sinapic acid solutions at 5 μ l min⁻¹, mixed with the mobile phase through a T-piece. Nitrogen was used as the nebulizer gas and for desolvation at flow rates of 50 and 900 L h⁻¹, respectively. The source capillary voltage was set to 3 kV and temperature to 135°C. Desolvation was performed at 400°C. For all compounds, the cone tension was optimized at 25 V. For collision-induced dissociation, argon was used as the collision gas at a pressure of 3×10^{-3} mbar. Full-scan (100–900 *m/z* in negative mode, 230–900 *m/z* in positive mode), selected ion monitoring (SIR), daughter scan and multiple reaction monitoring modes were used for analysis.

Acknowledgements

Thanks are due to Drs D. Werck-Reichhart and M. Matsuno for valuable scientific discussions and for sharing results before publication. We thank Drs P. Constabel and K. Richards for careful reading of the manuscript and Drs A. Skirycz and B. Mueller-Roeber (Postdam, Germany) for providing the tapetum-specific promoter. The assistance of D. Meyer in histochemical analysis, M. Alioua in DNA sequencing, and Dr M. Erhardt for electronic microscopy is gratefully acknowledged. We are grateful to the Salk Genomic Analysis Laboratory (La Jolla, CA, USA) for providing the T-DNA mutant and to the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (UK) for distributing the seeds. The UPLC/MS/MS system was co-financed by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Louis Pasteur, the Région Alsace, INRA and Tepral Company. This work was supported by doctoral fellowships of the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche to EG and SB.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Fragmentation patterns obtained by collision induced dissociation (CID) of compounds 1 and 2

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

References

- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J. et al. (2003) Genomewide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. Science, 301, 653–657.
- Alves-Ferreira, M., Wellmer, F., Banhara, A., Kumar, V., Riechmann, J.L. and Meyerowitz, E.M. (2007) Global expression profiling applied to the analysis of Arabidopsis stamen development. *Plant Physiol.* 145, 747–762.
- Besseau, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B. and Legrand, M. (2007) Flavonoid accumulation in Arabidopsis repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *Plant Cell*, **19**, 148–162.
- Blackmore, S., Wortley, A.H., Skvarla, J.J. and Rowley, J.R. (2007) Pollen wall development in flowering plants. *New Phytol.* **174**, 483–498.
- Bokern, M., Witte, L., Wray, V., Nimtz, M. and Meurer-Grimes, B. (1995) Trisubstituted hydroxycinnamic acid spermidines from Quercus Dentata pollen. *Phytochemistry*, **39**, 1371–1375.
- Burbulis, I.E., Iacobucci, M. and Shirley, B.W. (1996) A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in Arabidopsis. *Plant Cell*, 8, 1013–1025.

© 2009 The Authors Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd, The Plant Journal, (2009), doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03773.x

- Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735–743.
- 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., Svatos, A. and Gershenzon, J. (2007b) Identification and characterization of the BAHD acyltransferase malonyl CoA: anthocyanidin 5-O-glucoside-6"-Omalonyltransferase (At5MAT) in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 581, 872–878.
- Edlund, A.F., Swanson, R. and Preuss, D. (2004) Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. *Plant Cell*, 16(Suppl.), S84–S97.
- Fellenberg, C., Milkowski, C., Hause, B., Lange, P.R., Bottcher, C.T., Schmidt, J. and Vogt, T. (2008) Tapetum specific location of a cation-dependent O-methyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 56, 132–145.
- Geoffroy, P., Legrand, M. and Fritig, B. (1990) Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. *Mol. Plant Microbe Interact.* **3**, 327–333.
- Herdt, E., Sutfeld, R. and Wiermann, R. (1978) The occurrence of enzymes involved in phenylpropanoid metabolism in the tapetum fraction of anthers. *Cytobiologie*, **17**, 433–441.
- 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.
- Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet, B. and Legrand, M. (2004) Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, 16, 1446–1465.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, S., Widmayer, P., Gruissem, W. and Zimmerman, P. (2008) Genevestigator V3: a reference expression database for the metaanalysis of transcriptomes. *Adv. Bioinformatics*, vol 2008, Article ID 420747.
- Ito, T., Nagata, N., Yoshiba, Y., Ohme-Takagi, M., Ma, H. and Shinozaki, K. (2007) Arabidopsis MALE STERILITY1 encodes a PHD-type transcription factor and regulates pollen and tapetum development. *Plant Cell*, **19**, 3549–3562.
- Koltunow, A.M., Truettner, J., Cox, K.H., Wallroth, M. and Goldberg, R.B. (1990) Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell*, 2, 1201–1224.
- Landry, L.G., Chapple, C.C. and Last, R.L. (1995) Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol.* **109**, 1159–1166.
- 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.
- Martin-Tanguy, J., Perdrizet, E., Prevost, J. and Martin, C. (1982) The distribution of hydroxycinnamic acid amides in fertile and cytoplasmic male sterile lines of maize. *Phytochemistry*, 21, 1939– 1945.
- Meurer, B., Wiermann, R. and Strack, D. (1988) Phenylpropanoid patterns in fagales pollen and their phylogenetic relevance. *Phy*tochemistry, 27, 823–828.
- Mo, Y., Nagel, C. and Taylor, L.P. (1992) Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for

flavonols in functional pollen. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 89, 7213–7217.

- Morant, M., Jorgensen, K., Schaller, H., Pinot, F., Moller, B.L., Werck-Reichhart, D. and Bak, S. (2007) CYP703 is an ancient cytochrome P450 in land plants catalyzing in-chain hydroxylation of lauric acid to provide building blocks for sporopollenin synthesis in pollen. *Plant Cell*, **19**, 1473–1487.
- Murphy, D.J. (2006) The extracellular pollen coat in members of the Brassicaceae: composition, biosynthesis, and functions in pollination. *Protoplasma*, 228, 31–39.
- Negrel, J. and Smith, T.A. (1984) The phosphohydrolysis of hydroxycinnamoyl-CoA thioesters in plant extracts. *Phytochemistry*, 23, 31–34.
- Negrel, J., Javelle, F. and Paynot, M. (1991) Separation of putrescine and spermidine hydroxycinnamoyl transferases extracted from tobacco callus. *Phytochemistry*, **30**, 1089–1092.
- Niggeweg, R., Michael, A.J. and Martin, C. (2004) Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nat. Biotechnol.* 22, 746–754.
- Owen, H.A. and Makaroff, C.A. (1995) Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). *Protoplasma*, 185, 7–21.
- Piffanelli, P., Ross, J.H.E. and Murphy, D.J. (1998) Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains. Sex. Plant Reprod. 11, 65–80.
- 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.
- Scott, R.J., Spielman, M. and Dickinson, H.G. (2004) Stamen structure and function. *Plant Cell*, **16**(Suppl.), S46–S60.
- Skirycz, A., Jozefczuk, S., Stobiecki, M., Muth, D., Zanor, M.I., Witt, I. and Mueller-Roeber, B. (2007) Transcription factor AtDOF4;2 affects phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* **175**, 425–438.
- Stockigt, J. and Zenk, M.H. (1975) Chemical syntheses and properties of hydroxycinnamoyl-coenzyme A derivatives. Z. Naturforsch. [C], 30, 352–358.
- St-Pierre, B. and De Luca, V. (2000) Evolution of acyltransferase genes: origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. *Recent Adv. Phytochemistry*, 34, 285–315.
- St-Pierre, B., Laflamme, P., Alarco, A.M. and De Luca, V. (1998) The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. *Plant J.* 14, 703–713.
- Toufighi, K., Brady, S.M., Austin, R., Ly, E. and Provart, N.J. (2005) The botany array resource: e-northerns, expression angling, and promoter analyses. *Plant J.* 43, 153–163.
- Tsai, C.J., Harding, S.A., Tschaplinski, T.J., Lindroth, R.L. and Yuan, Y. (2006) Genome-wide analysis of the structural genes regulating defense phenylpropanoid metabolism in Populus. *New Phytol.* **172**, 47–62.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. and Baulcombe, D. (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33, 949–956.
- Wagner, A., Ralph, J., Akiyama, T., Flint, H., Phillips, L., Torr, K., Nanayakkara, B. and Te Kiri, L. (2007) Exploring lignification in conifers by silencing hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyltransferase in Pinus radiata. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **104**, 11856–11861.

Journal compilation © 2009 Blackwell Publishing Ltd, The Plant Journal, (2009), doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03773.x

14 Etienne Grienenberger et al.

- Walters, D., Meurer-Grimes, B. and Rovira, I. (2001) Antifungal activity of three spermidine conjugates. *FEMS Microbiol. Lett.* 201, 255–258.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V. and Provart, N.J. (2007) An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE*, 2, e718.
- Yang, Q., Reinhard, K., Schiltz, E. and Matern, U. (1997) Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/ben-

zoyl-CoA:anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, Dianthus caryophyllus L. *Plant Mol. Biol.* **35**, 777–789.

- Yang, C., Vizcay-Barrena, G., Conner, K. and Wilson, Z.A. (2007) MALE STERILITY1 is required for tapetal development and pollen wall biosynthesis. *Plant Cell*, **19**, 3530–3548.
- Zamble, A., Sahpaz, S., Hennebelle, T., Carato, P. and Bailleul, F. (2006) N1,N5,N10-Tris(4-hydroxycinnamoyl)spermidines from Microdesmis keayana roots. *Chem. Biodivers.* **3**, 982–989.

IV – Analyse fonctionnelle de SHT : complément à l'article

L'analyse des mutants KO *sht* n'a pas permis de révéler un phénotype développemental évident nous permettant d'orienter nos recherches pour l'élucidation de la fonction des conjugués de spermidine. La forme globale du grain de pollen est affectée, indiquant la nécessité de la présence d'un tel composé pour que, directement ou non, le pollen se développe normalement. Cependant, ni les causes réelles du phénotype, ni leurs conséquences ne sont correctement comprises à ce jour. Pour tenter de mieux comprendre l'intérêt pour la plante de synthétiser de tels composés au niveau de son pollen, j'ai réalisé différentes expériences complémentaires.

1/SHT et la viabilité du pollen

Malgré les altérations claires du pollen du mutant sht, celui-ci ne présentait pas de stérilité mâle. Ceci indique qu'une partie au moins des grains de pollen est viable, mais comme l'observation plus précise du pollen mutant révèle une certaine hétérogénéité, il était possible qu'une certaine proportion du pollen mutant ne soit pas viable. Pour tester cette hypothèse, j'ai réalisé des tests de viabilité en me servant de la coloration d'Alexander (**fig. R1-6**). Des étamines provenant de plantes sauvages et mutantes ont été prélevées puis déposées entre lame et lamelle dans de la solution d'Alexander. Cette solution colore en rose le cytoplasme des pollens viables, et en vert ceux qui ne le sont pas. Comme décrit dans la littérature, la très grande majorité (>99%) des grains de pollen des plantes sauvages apparaissent viables (**fig. R1-6A**) et la même coloration pour le pollen mutant ne révèle pas une proportion plus importante de pollen non viable, pour une dizaine d'étamines testées.

La mutation de *SHT* n'affecte donc pas la viabilité du pollen dans les conditions standard de culture.

2/ Rôle de SHT dans la germination du pollen

Si dans les conditions optimales de croissance, le mutant *sht* ne montrait pas une réduction de la production de graines, donc une diminution de la fertilité mâle, cela pouvait s'expliquer par une production nettement excédentaire du pollen pour l'autofécondation d'*Arabidopsis*. Pour voir si le pollen issu du mutant *sht* ne présentait pas dans l'ensemble une réduction de sa capacité germinative, j'ai réalisé des expériences de germination *in vitro*. Comme la plupart des pollens tricellulaires, le pollen d'*Arabidopsis* requiert des conditions très précises pour obtenir un bon taux de germination *in vitro*. Récemment une publication a décrit des conditions optimales pour la germination du pollen d'*Arabidopsis* (Boavida and McCormick, 2007), et en les utilisant, nous avons réussi à obtenir un taux


Figure R1-6. Analyse de la viabilité du pollen.

Coloration d'Alexander révélant la viabilité du pollen. Le grain de pollen dont le cytoplasme est rose est viable, le pollen au cytoplasme vert n'est pas viable (flèche). (A) étamine d'une plante sauvage. (B) étamine du mutant *sht*.



Figure R1-7. Tests *in planta* de germination du pollen.

Les stigmates d'une plante sauvage d'*Arabidopsis* sont pollinisés manuellement avec du pollen sauvage (A et C) ou du pollen du mutant *sht* (B et D). Après 24h, le pistil est fixé puis coloré à l'aniline qui révèle la callose du tube pollinique sous lumière UV.

de germination d'environ 80 %. Ce taux est suffisant pour démontrer une différence entre deux génotypes si le nombre de pollen pris en compte est suffisamment élevé, et si la différence de germination est suffisamment grande. Du pollen issu d'une plante sauvage et du mutant *sht* a été mis à germer 16 h à 22°C. Environ 200 grains de pollen ont alors été examinés. 78% et 74% de grains de pollen ont germé, respectivement pour le pollen sauvage et le pollen mutant. Cette différence n'apparaît pas significative et ne permet donc pas de révéler une diminution du taux de germination du pollen *sht* par rapport au sauvage.

Si la germination du pollen ne semble pas affectée sur un milieu synthétique, on ne peut pas exclure l'intervention des composés de spermidine dans la signalisation complexe qui fait suite au dépôt de pollen sur le stigmate et qui aboutit à la formation du tube pollinique. Les expériences *in vitro* n'étant pas à même de révéler ce type d'interaction, je suis passé à des tests de germination *in vivo* pour voir si, quantitativement ou qualitativement, n'était pas observée une différence entre les deux types de pollen.

La pollinisation a été faite manuellement avec du pollen sauvage et mutant, sur les stigmates de fleurs sauvages dont les étamines avaient été enlevées. 24 h après la pollinisation, les pistils sont prélevés, fixés puis colorés à l'aniline. Ce colorant, en se fixant sur la callose, fluoresce sous lumière UV et permet de révéler le nombre et l'aspect des tubes polliniques.

L'observation de plusieurs pistils pollinisés pas le pollen sauvage ou mutant ne permet pas de mettre en évidence des différences claires entre les génotypes, que ce soit au niveau du taux de germination ou de l'aspect du tube pollinique (**fig. R1-7**). Les hydroxycinnamoyl spermidines, produites par SHT, ne semblent donc pas non plus impliquées dans les processus de reconnaissance pollen-stigmate, ou dans la formation et l'élongation du tube pollinique.

3/ Rôle des hydroxycinnamoyl spermidines dans la protection contre les UV-B

La dihydroxyféruloyl-monosinapoyl spermidine produite par SHT, absorbe fortement dans les UV-B et A (λ max = 316 nm). D'autre part, les rayonnements solaires contiennent une part importante de ces rayons UV et plusieurs publications ont montré l'importance des dérivés sinapoyl dans la protection contre les UV-B (par exemple (Landry et al., 1995)). En se basant sur ces données, nous nous sommes interrogés sur le rôle des dérivés de spermidine dans la protection du pollen contre les rayonnements UV-B. J'ai réalisé des tests de germination *in vitro* du pollen soumis à différentes doses d'UV-B (λ max = 312 nm). En soumettant le pollen à des doses croissantes d'UV, j'ai obtenu des taux de germination intermédiaires, entre 80 % et 0 %. Ces conditions ont été utilisées pour comparer le taux de germination du pollen *sht* et du pollen sauvage. Les résultats sont restés préliminaires, cependant, pour les différentes doses d'UV, nous n'avons pas observé de diminution significative de



Figure R1-8. Ultrastructure de la paroi du pollen d'*Arabidopsis* sauvage et du mutant *sht*. Microscopie électronique à transmission de coupes de pollen (A, C, E et G) pollen d'*Arabidopsis* sauvage. (B, D, F et H), pollen du mutant *sht*. Barres pour A et $B = 2 \mu m$. Barres pour C, D, E, F et G = 500 nm.

la germination du pollen mutant par rapport au pollen sauvage. En conséquence, les composés de spermidine ne semblent pas intervenir dans la protection du pollen contre les rayonnements UV-B.

4/ Rôle de SHT dans la structure de la paroi du pollen

Nous avons montré que les dérivés de spermidine synthétisés par SHT sont facilement extractibles du pollen en utilisant un solvant organique. Cette observation suggère leur présence dans le manteau du pollen plutôt que dans un polymère de l'exine. Cependant, la littérature rapportant la présence d'acides hydroxycinnamiques dans la sporopollénine, nous ne pouvons pas exclure qu'une partie des hydroxycinnamoyl spermidines soit constitutive de l'exine. Cette hypothèse pourrait expliquer les malformations de la paroi du pollen *sht*, qui sans la présence de ces composés, aurait des propriétés mécaniques modifiées.

Afin de déceler des différences dans la structure de la paroi/manteau du pollen, j'ai observé des coupes de pollen d'*Arabidopsis* sauvage et du mutant *sht* en microscopie électronique à transmission (**fig. R1-8**). Cependant, ni l'épaisseur de la paroi, ni sa structure ne semblent affectées chez le mutant par rapport au sauvage. Il apparaît donc que l'absence du conjugué de spermidine n'affecte pas l'architecture de base de la paroi du pollen.

5/ Rôle des hydroxycinnamoyl spermidines dans la fertilité mâle

Les flavonoïdes sont des constituants ubiquitaires du pollen des plantes (Ylstra et al., 1996), cependant leur fonction apparaît différente d'une espèce à l'autre. Chez le pétunia et le maïs, par exemple, leur absence conduit à la stérilité mâle (Van der Meer et al., 1992), mais chez d'autres espèces, dont *Arabidopsis*, leur absence n'a pas d'influence sur la fertilité mâle (Ylstra et al., 1996). Cette différence fonctionnelle est surprenante et pourrait suggérer l'implication de métabolismes alternatifs qui auraient remplacé ou complémenté celui des flavonoïdes au cours de l'évolution. L'extraction des phénols du pollen d'*Arabidopsis* indique la présence de deux flavonoïdes majoritaires (identifiés comme étant une hexose-quercetine-hexose et un hexose-kaempférol-hexose) (**fig. R1-9E**), et dans cette même extraction sont retrouvés les hydroxycinnamoyl spermidines synthétisés pas SHT. Ces derniers composés partagent des propriétés physico-chimiques avec les flavonoïdes, et pourraient jouer un rôle semblable à celui des flavonoïdes pour la fertilité mâle. Dans cette hypothèse, l'absence d'une seule classe de ces métabolites n'affecterait pas la fertilité mâle. Pour tester cette hypothèse, j'ai réalisé un croisement entre le mutant *sht* et une lignée transgénique exprimant une construction en épingle à cheveux aboutissant au silencing de la *Chalcone Synthase (CHS)*. À la



Figure R1-9. Analyses métaboliques de bourgeons floraux ou de pollen de différentes lignées d'*Arabidopsis*

Chromatogrammes de RP-LC d'extraits de phénols solubles de (A) bourgeons floraux sauvages. (B) bourgeons floraux du mutant KO *sht*, les hydroxycinnamoyl spermidines ne sont plus présentes. (C) bourgeons floraux d'une lignée *CHS-RNAi*, les flavonoïdes ne sont plus présents. (D) bourgeons floraux d'une lignée *sht* x *CHS-RNAi*, les hydroxycinnamoyl spermidines et les flavonoïdes ne sont plus présents. (E) pollen sauvage, les hydroxycinnamoyl spermidines et deux flavonoïdes sont extraits du pollen. SG, Sinapoyl-Glucose; Q1, Hexose-Quercetine-Hexose; K1, Hexose-Kaempférol-Hexose; SM, Sinapoyl-Malate; 1, trihydroxyféruloyl spermidine; 2, dihydroxyféruloyl-monosinapoyl spermidine.

génération F2, j'ai sélectionné des plantes homozygotes pour *sht* et hétérozygotes ou homozygotes pour la construction RNAi. Des extractions métaboliques de phénols des bourgeons floraux ont été réalisées sur ces lignées et analysées en LC-MS. Le chromatogramme révèle l'absence totale de flavonoïdes ainsi que la disparition des spermidines acylées. Seuls deux composés majeurs restent visibles, identifiés par spectrométrie de masse comme étant du sinapoyl-malate et du sinapoyl-glucose (**fig. R1-9D**).

L'analyse phénotypique de ce croisement n'a cependant pas révélé une perte ou une diminution de la fertilité mâle associée à la perte des flavonoïdes et des hydroxycinnamoyl spermidines. Ces composés ne semblent donc pas avoir, chez *Arabidopsis*, des fonctions redondantes et essentielles pour la fertilité mâle dans les conditions standard, comme les flavonoïdes peuvent en avoir chez d'autres espèces.

6/ Etude de l'expression constitutive de SHT

J'avais obtenu une lignée de plantes transgéniques surexprimant *SHT* dans le tissu où elle est normalement exprimée, en utilisant le promoteur *TA29*, fort et spécifique du tapétum (Koltunow et al., 1990). Cette surexpression avait abouti à une suraccumulation des dérivés de spermidine dans les bourgeons floraux. Pour associer une fonction biologique à ces composés, j'ai également obtenu des plantes surexprimant *SHT* sous le contrôle du promoteur 35S du CAMV, fort et (quasi) constitutif. La présence de spermidines acylées dans des tissus où elles ne sont normalement pas présentes, pourrait provoquer un phénotype révélateur de leurs rôles. Plusieurs lignées de transformants primaires ont été criblées par immunoblot, pour leur expression de *SHT* dans les feuilles, et les lignées présentant la meilleure accumulation de la protéine ont été sélectionnées. J'ai alors extrait et analysé les phénols solubles de ces feuilles. Étonnement, ces analyses n'ont jamais permis d'identifier la présence d'un conjugué de polyamine avec un acide hydroxycinnamique dans les feuilles, cela, malgré l'expression importante de *SHT*. Ces résultats pourraient révéler l'absence des substrats nécessaires dans les tissus de la feuille.





Analyses des plantes exprimant le gène rapporteur GUS sous le contrôle des promoteurs de HCT (A, B et E) ou HCT-like1 (C, D et F). Les observations ont été réalisées à la loupe binoculaire. fl, fleur ; pi, pistil ; pd, pédicelle ; st, stigmate ; c, cortex ; cc, cylindre central.

Chapitre 1. Discussion et Perspectives

I – At5g57840 (HCT-like1)

Sur la base de sa structure, HCT-like1 est une acyltransférase putative appartenant à la superfamille des acyltransférases du type BAHD. Chez *Arabidopsis*, elle est l'homologue le plus proche de HCT, et les analyses phylogénétiques la placent dans un clade constitué de transférases utilisant toutes un hydroxycinnamoyl-CoA comme substrat. Ces éléments suggèrent l'utilisation probable d'un substrat similaire par HCT-like1 et son implication dans un métabolisme lié aux phénylpropanoïdes.

L'étude de l'expression du gène chez *Arabidopsis* a révélé un niveau d'expression faible et localisé dans des organes spécifiques comme les racines, les pédicelles ou les pistils. Son expression tissulaire est restreinte aux tissus vasculaires, comme les vaisseaux conducteurs du pistil et du pédicelle, ou le cylindre central de la racine. De façon intéressante, le patron d'expression de HCT se superpose avec celui de HCT-like1, dans les organes où HCT-like1 est exprimé (**fig. D1-1**). Ces observations suggèrent l'intervention de HCT-like1 dans un métabolisme associé à la synthèse d'un polymère structural aux fonctions proches de la lignine. Mais contrairement à HCT, HCT-like1 n'est présente qu'au niveau d'organes particuliers, elle pourrait donc participer à la synthèse d'un polymère spécifique de ces organes, légèrement différent de la lignine et présent en faible quantité.

Les différents tests d'activité imaginés pour HCT-like1 ont tous été négatifs. Cependant, l'incubation de l'enzyme recombinante avec un hydroxycinnamoyl-CoA conduit systématiquement à la libération d'une partie de l'acide correspondant par rupture de la liaison thiolester. Cette activité thiolesterase aspécifique est retrouvée chez d'autres BAHD (dont HCT) quand le donneur d'acyle est présent et en absence de l'accepteur, et suggère encore une fois l'utilisation de ce type de substrat par HCT-like1. L'approche de la fonction de HCT-like1 par la détermination de son activité enzymatique reste cependant aléatoire au regard de la multitude des substrats possibles, et sans hypothèse précise sur le produit à former.

Pour avoir une idée de la conservation du gène chez les plantes, les homologues à HCT-like1 ont été recherchés dans les bases de données. Excepté chez des espèces proches d'*Arabidopsis*, comme *Brassica rapa* ou *Raphanus raphanistrum* pour lesquelles un homologue présentant 80% d'identité avec *HCT-like1* existe, il n'y a pas d'homologues identiques à plus de 45% chez la plupart des autres espèces. *HCT-like1* ne possède donc pas d'orthologues largement répandus dans le règne végétal. Même le peuplier, connu pour la diversité de son métabolisme phénolique ne possède pas d'homologue conservé (**fig. D1-2**). L'apparition du gène au cours de l'évolution semble donc tardive et restreinte à quelques espèces de la famille des *Brassicaceae*.



Figure D1-2. Arbre phylogénétique de HCT et des HCT-like Analyse phylogénétique des HCT et HCT-like du peuplier et d'*Arabidopsis*. Les HQT de différentes espèces et l'HHT de l'avoine sont également présentées.

L'étude du mutant *hct-like1* n'a pas permis de révéler une fonction associée à ce gène. Aucun phénotype visuel n'est observé, ni aucune accumulation différentielle de métabolites par rapport au sauvage. La faible expression du gène suggère une intervention dans un métabolisme mineur, rendant difficile l'étude de son rôle dans la plante. Certaines données de microarrays indiquent toutefois une expression relativement forte dans le testa de la graine (données Genevestigator). Ce type d'expression très spécifique n'a pas été analysé par les lignées promoteur-GUS, et devra l'être à la vue de ces données. Si une telle expression est détectée, de nouvelles perspectives seraient ouvertes pour l'analyse fonctionnelle de *HCT-like1*, et son implication dans le développement de la graine pourra être étudiée.

II – Spermidine Hydroxycinnamoyl Transférases (SHT)

La présence d'hydroxycinnamoyl spermidines chez les plantes est rapportée de longue date (Martin-Tanguy et al., 1978), mais la *Spermidine Hydroxycinnamoyl Transférase* d'*Arabidopsis* est le premier élément génétique de ce type de métabolisme à avoir été caractérisé. Sa découverte facilitant la caractérisation d'autres acteurs (comme la CCoAOMT-like/TSM1), a permis de connaître les événements catalytiques menant à leur synthèse dans la plante.

1/ Conservation et distribution des Spermidine Hydroxycinnamoyl Transférases

Si les trihydroxycinnamoyl spermidines sont retrouvés au niveau du pollen de nombreuses espèces, il ne semble pas y avoir une conservation stricte de ces composés chez les Angiospermes, et, du moins, pas une conservation des éléments génétiques impliqués. La recherche de gènes homologues à *SHT* chez d'autres espèces de plantes révèle une bonne conservation dans la famille des *Brassicaceae. Brassica rapa* ou *napus*, ou encore *Raphanus raphanistrum* ou *sativus* possèdent un homologue de SHT identique à environ 80%, dont les transcrits sont retrouvés dans des banques d'EST de bourgeons floraux. Cependant chez les espèces d'autres familles, la conservation du gène est variable et dans l'ensemble faible. La vigne présente un homologue identique à 68% à SHT qui, de façon intéressante, est retrouvé dans une banque d'EST de la fleur. De façon similaire, SHT présente 62 % d'identité avec une HCT-like du peuplier (**fig. D2-2**), qui, d'après les données de microarrays, est exprimé dans les organes mâles. Il semble donc exister de véritables orthologues à SHT chez les *Brassicaceae*, mais aussi dans d'autres familles de plantes. Cependant, chez la plupart des espèces dont nous possédons des données de génomique, aucun homologue présentant une identité supérieure à 45% n'a été trouvé. C'est le cas notamment du tabac, dont nous savons qu'il possède ce type de composés dans la fleur, et dont l'homologue le plus proche possède seulement 39% d'identité avec



Figure D1-3. Comparaison de la voie des monolignoles et des phénolamides du pollen Le schéma établi un parallèle entre les réactions du même type (vert : transfert d'acyle ; bleu : hydroxylation ; violet : méthylation) faisant intervenir des enzymes homologues chez *Arabidopsis*.

SHT. Ce gène n'est donc pas strictement conservé au travers du règne végétal, et ne semble pas toujours associé à la présence d'hydroxycinnamoyl spermidines dans les fleurs.

2/ Voie des phénolamides du pollen et plasticité métabolique

La recherche de gènes corégulés avec *SHT* nous a permis de sélectionner une *CCoAOMT-like* (*TSM1*), dont la caractérisation a confirmé son implication dans la même voie de synthèse (Fellenberg et al., 2008; Grienenberger et al., 2009). De même, deux gènes codant pour des hydroxylases à cytochromes P450 (*cyp98A8* et *cyp98A9*), les plus proches homologues de la C3H chez *Arabidopsis*, sont apparus fortement corégulés avec *SHT* et ont été décrits comme intervenant dans la même voie de synthèse (Matsuno et al., 2009; Fellenberg et al., 2009). Ainsi, de façon intéressante, trois gènes intervenant séquentiellement dans le métabolisme des monolignols, possèdent un/des homologue(s) intervenant séquentiellement dans un autre métabolisme phénolique. L'analyse des *CYP98A8* et *A9* suggère leur apparition récente via une rétroposition et une duplication suivies d'une néofonctionnalisation rapide de ces gènes, qui ne sont présents que chez *Arabidopsis* et *Brassica napus* (Matsuno et al., 2009). D'un autre coté, la présence d'introns notamment pour *SHT* et *TSM1* suggère des mécanismes évolutifs différents. Les quatre membres de la voie ont alors subi une néofonctionnalisation identique. Cette convergence de fonction est étonnante et pourrait relever d'une sélection positive forte aboutissant à une évolution adaptative qui serait à l'origine de l'acquisition par les *Brassicaceae* d'une voie nouvelle de synthèse des phénolamides du pollen.

De façon surprenante, les activités des enzymes de la voie des monolignols et de phénolamides du pollen ne sont pas strictement parallèles. Par exemple, la C3'H réalise l'hydroxylation en position 3 du phénol alors que CYP98A8 (C3'H like) réalise l'hydroxylation en position 5. De même pour la CCoAOMT1 qui méthyle la position 3 alors que TSM1 (CCoAOMT-like) agit en position 5. De plus, l'analyse de plantes *CCoAOMT1 RNAi* révèle une diminution drastique d'hydroxycinnamoyl spermidines dans les bourgeons floraux (Fellenberg et al., 2009), indiquant également l'implication de cette enzyme dans cette synthèse, probablement en fournissant le féruloyl-CoA à SHT. Ainsi, la première voie, peu spécifique, semble fournir le flux métabolique à la seconde, qui est hautement spécifique du développement du pollen (**fig. D1-3**).

3/ Voie des phénolamides du pollen et « channeling » métabolique

Les cellules du tapétum sont extrêmement actives métaboliquement, et leurs compartiments doivent contenir une concentration élevée des métabolites intermédiaires ou finaux. De plus, ces synthèses doivent subir des régulations strictes pour jouer pleinement leur rôle dans les processus complexes du développement du pollen. Elles doivent donc être efficaces dans un temps court, et l'efficacité métabolique requise pourrait nécessiter une organisation particulière des protéines entre elles. L'idée de l'association des enzymes d'une même voie en complexe multiprotéique est évoquée de longue date sous le nom de « métabolons ». Cette organisation permettrait d'isoler les sites actifs des enzymes de la compétition des autres métabolites de la cellule, en transférant directement le métabolite physiologique d'un site actif à l'autre sans dilution dans le cytoplasme, permettrant une catalyse efficace du substrat initial en son produit, après plusieurs étapes catalytiques. Ce type de relocalisation d'enzymes normalement cytosoliques, apporte également un niveau de régulation supplémentaire, tenant compte de la localisation subcellulaire des différents « pools » de substrat. Une telle association a été démontrée entre la PAL1 et la C4H dans le métabolisme général des phénylpropanoïdes (Rohde et al., 2004) et la voie des phénolamides du pollen possède des caractéristiques similaires, avec la présence de cytochromes P450 qui permettraient d'ancrer le complexe au niveau des membranes. Les trois types d'enzymes, fortement corégulés et intervenant dans une même voie de synthèse semblent donc constituer un modèle particulièrement adéquat pour l'étude de ce type d'interaction.

4/ De la fonction des phénolamides du pollen

La véritable fonction biologique des phénolamides du pollen reste mystérieuse et leur large distribution dans le règne végétal est en contradiction avec le faible phénotype associé à leur absence chez les mutants. Cependant, les analyses des mutants font suite à leur croissance dans des conditions optimales, et des investigations plus poussées devraient êtres réalisées pour analyser l'influence de la température, de l'humidité, de la lumière ou de la pression microbienne sur la fertilité du pollen mutant. Dans les conditions standard, le pollen du mutant *sht* présente toutefois des malformations et apparaît collant. Les grains de pollen mutant s'agglutinent, produisant des amas qui ne sont pas observés avec le pollen sauvage. Les caractéristiques du manteau apparaissent changées, altérant probablement ses propriétés d'échange avec son environnement. Les polyamines sont régulièrement associées à la régulation des échanges hydriques, et le phénotype du pollen serait compatible avec une hydratation altérée du grain de pollen. Le comportement du pollen mutant dans des conditions d'humidité faible pourrait donc être particulièrement intéressant à analyser. Cependant, ce type d'étude requiert un contrôle strict et reproductible des conditions d'humidité, difficile à obtenir sans matériel adapté.

Ces derniers temps, différents travaux ont porté sur l'étude de la synthèse des phénolamides du pollen d'*Arabidopsis* via la caractérisation des gènes impliqués (Fellenberg et al., 2008; Grienenberger et al., 2009; Matsuno et al., 2009; Fellenberg et al., 2009). L'étude fonctionnelle a été



Figure D1-4. Analyse de l'expression de SHT dans les fleurs d'Arabidopsis

L'expression de *SHT* est visualisée par le gène rapporteur GUS, exprimant la β -glucuronidase sous le contrôle du promoteur de *SHT*. L'expression du gène dans les anthères est visible pour chaque fleur à un stade donné, l'expression dans le stigmate est visible aléatoirement, sans relation avec un stade de développement précis.



Figure D1-5. Voies de synthèse et métabolisation hypothétique des phénolamides du pollen

Evènements métaboliques hypothétiques ayant recours à SHT pour la métabolisation de l'hydroxycinnamoyl spermidine du pollen d'*Arabidopsis*, associés à leur localisation spatiale et aux évènements physiologiques.

La diOH-féruloyl monosinapoyl spermidine est synthétisée par SHT, Cyp98A8 et TSM dans les cellules du tapétum et au cours du développement du pollen, avant son dépôt sur le manteau pollinique. Ce composé pourrait ensuite être métabolisé par SHT, au niveau du stigmate, au moment de la germination du pollen pour produire des hydroxycinnamoyl-CoA et de la spermidine libre.

entreprise par les groupes de recherche, sans toutefois aboutir à des résultats clairs permettant d'assigner un rôle précis à ces composés pour la biologie du pollen.

L'étude récente de SDT, l'acyltransférase impliquée dans la biosynthèse d'hydroxycinnamoyl spermidines de la graine d'*Arabidopsis*, a montré l'expression du gène au cours du développement de la graine, mais aussi de façon transitoire au moment de sa germination. Cette observation, associée à la capacité de l'enzyme correspondante de réaliser la réaction inverse, *id es* de former du sinapoyl-CoA et de la spermidine à partir de sinapoyl spermidine, a permis d'émettre l'hypothèse d'une remobilisation du conjugué de spermidine au cours de la germination de la graine (Luo et al., 2009).

Cette hypothèse a également été testée pour *SHT*, dans un premier temps par la recherche de son expression dans le pollen, suite ou au cours de sa germination. L'accumulation de la protéine a été rechechée par immunoblot, à différents temps après l'induction de la germination par un milieu de germination synthétique, mais a conduit à un résultat négatif. D'un autre coté, l'étude attentive des lignées *pSHT-GUS* a révélé l'expression du gène également au niveau du stigmate mais de façon minoritaire et variable (**fig. D1-4**). L'aspect aléatoire du signal (>10%) nous l'a fait prendre pour un artéfact de la coloration, cependant celle-ci a été observée à plusieurs reprises, suggérant une réelle expression physiologique. L'expression observée de *SHT* au niveau du stigmate pourrait aussi s'expliquer par une réutilisation du conjugué de spermidine au moment de la germination du pollen, et de façon cohérente, par les tissus en contact avec le manteau pollinique. Ainsi, il est possible que *SHT* soit exprimé transitoirement dans le stigmate, au cours des processus précoces de la germination du pollen, permettant la remobilisation des hydroxycinnamoyl spermidines en spermidine libre et hydroxycinnamoyl-CoA qui pourraient être utilisés au cours des processus germinatifs (**fig. D1-5**). Cet état physiologique étant très fugitif, son observation rare et aléatoire dans les plantes *pSHT-GUS* apparaît cohérente.

La réutilisation des conjugués de spermidine au cours de la germination du pollen possède des avantages indéniables, tels que la disponibilité rapide et sans énergie de métabolites généraux, utilisés couramment dans des synthèses diverses. Le ratio entre les hydroxycinnamoyl-CoA pourrait aussi jouer un rôle. Chez *Arabidopsis* par exemple, la présence de deux groupements hydroxyféruloyl pour un groupement sinapoyl, pourrait s'expliquer par les besoins spécifiques de la germination du pollen. Ainsi, l'utilisation de l'hydroxycinnamoyl spermidine du pollen par SHT ne requiert qu'une enzyme au lieu des quatre nécessaires à une synthèse *de novo*, peu d'énergie et un niveau de régulation inférieur puisque le bon ratio est déjà défini. Ce type de processus apporterait donc un avantage certain à la plante, sa mise en place et sa conservation au cours de l'évolution peut sembler cohérente, et expliquerait la large distribution des phénolamides du pollen.

Si cette hypothèse s'avérait juste, elle mettrait à jour un niveau inédit de complexité métabolique, et notamment comment la métabolisation différentielle se basant sur l'équilibre substrat/produit, pourrait être mise à profit pour répondre aux besoins spécifiques des processus développementaux.

Pour confirmer l'hypothèse de la réutilisation par SHT de l'acyl-spermidine, des expériences complémentaires sont à prévoir. La première étant la vérification de la capacité de l'enzyme à réaliser la réaction inverse à la synthèse de la triacyle spermidine. Celle-ci est très probable au regard des caractéristiques connues des BAHD (par exemple HCT est capable de l'effectuer efficacement), de plus, elle est thermodynamiquement possible puisque SDT la réalise sur un substrat similaire. Ainsi des tests d'activité *in vitro* avec la protéine recombinante devront êtres réalisés pour quantifier l'efficacité catalytique de SHT dans les deux sens de réaction. De même, la relation précise entre l'expression de *SHT* dans le stigmate et les processus germinatifs devra être établie. Jusqu'à présent il n'existe pas de certitude d'une relation de cause à effet entre la pollinisation et l'expression de *SHT* dans le stigmate le gène rapporteur *pSHT-GUS*, permettant éventuellement de valider la relation et de mieux appréhender les processus qui auraient recours à *SHT* au cours de la germination du pollen.

Chapitre 2

Caractérisation de nouveaux acteurs de biosynthèse de la sporopollénine



Figure R2-1. Sections transversales de bourgeons floraux d'Arabidopsis sauvage et acos5

Coupes transversales de bourgeons floraux colorées au bleu de toluidine. (A, B et C) bourgeons d'une plante sauvage. (D, E et F) bourgeons du mutant *acos5*. Trois stades du développement du pollen sont montrés correspondant au stade tétrade (A et D), microspore (B et E) et pollen mature (C et F). Après le stade tétrade, les microspores du mutant *acos5* présentent des anomalies de développement puis dégénèrent sans jamais former de paroi (colorée en vert chez le sauvage). Barre = 50 μ m.

Numéro AGI	r-value	Annotation
At1g62940	1.000	bait
At1g62940	1.000	Acyl-CoA synthase (ACOS5)
At1g69500	0.988	oxygen binding (CYP 704 B1)
At4g14080	0.985	β-1-3 glucanase
At4g35420	0.984	dihydroflavonol 4-reductase family
At4g20420	0.978	tapetum-specific protein-related
At3g52130	0.974	protease inhibitor/ lipid transfert protein
At1g01280	0.955	CYTOCHROME P450 (CYP 703 A2)
At4g34850	0.955	Chalcone and stilbene
At1g02050	0.950	」synthase family protein
At3g07450	0.950	protease inhibitor/ lipid transfert protein
At3g59530	0.949	strictosidine synthase family protein
At3g11980	0.945	MALE STERILITY 2 (MS 2)
At1g68540	0.943	oxidoreductase
At2g42940	0.943	DNA-binding family protein
At5g16920	0.933	similar to unknown protein
At3g42960	0.925	oxidoreductase (ATA 1)
At2g42990	0.914	lipase/hydrolase family protein
At4g29980	0.913	similar to unknown protein
At1g03390	0.896	transferase family protein

Figure R2-2. Analyse de corégulation de gène avec ACOS5

Liste des gènes présentant une régulation spatio-temporelle dans différentes conditions développementales et environnementales, proche de celle de *ACOS5*. La r-value représente la facteur de corégulation, qui est d'autant plus élevé que la corégulation est forte (Toufighi et al., 2005). Le panneau jaune est une réduction des résultats de micoarrays. Le colonnes représentent divers organes et situation physiologiques. La ligne rouge illustre la corégulation des gènes listés dans le développement floral.

Chapitre 2. Caractérisation de nouveaux acteurs de biosynthèse de la sporopollénine

I – Introduction : sélection de gènes exprimés dans les bourgeons floraux

Lors de l'analyse de *SHT*, nous avions réalisé une analyse de corégulation et avions sélectionné des gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme des phénylpropanoïdes. Outre la *CCoAOMT-like* que nous avons décrite et deux *CYP98*, nous avions également sélectionné une *4-Coumarate Ligase like* (*4CL-like*), dont la corégulation avec *SHT* n'était pas très forte, mais pouvait participer à une étape précoce de la synthèse des hydroxycinnamoyl spermidines en procurant les hydroxycinnamoyl-CoA à *SHT*. Nous avons obtenu un mutant d'insertion pour ce gène, et son analyse a révélé un phénotype de stérilité mâle. De façon surprenante, les analyses métaboliques réalisées sur les bourgeons du mutant *4CL-like* ne montraient pas de diminution d'accumulation des spermidines acylées, indiquant l'implication de ce gène dans un métabolisme différent.

Pour analyser les évènements menant à la perte de fertilité du mutant, j'ai réalisé des coupes transversales des bourgeons floraux du mutant *4cl-like* et du sauvage (**fig. R2-1**). Les analyses préliminaires ont montré que jusqu'au stade tétrade, le développement du pollen apparaît normal chez le mutant, mais passé le stade de la libération des microspores, le pollen présente des altérations importantes. Il ne se développe plus puis dégénère sans jamais former de parois.

Au cours de l'analyse de ce gène, une autre équipe de recherche a publié sa caractérisation, confirmant les phénotypes observés et incluant l'analyse biochimique de la protéine recombinante. Le gène, nommé *ACOS5*, est exprimé dans le tapétum après le stade tétrade, et code pour une enzyme capable d'estérifier des acides gras longs au CoA. Son implication dans la synthèse de la paroi a été caractérisée par l'analyse du mutant (Cf. 3^e partie de l'introduction) (de Azevedo Souza et al., 2009).

Au cours de l'analyse de ACOS5, nous avions réalisé une étude de corégulation de laquelle était sortie une liste de gènes très fortement corégulés avec ACOS5 (fig. R2-2). De façon intéressante, certains gènes connus pour être impliqués dans la synthèse de la sporopollénine y étaient présents. C'était le cas notamment de Male Sterility2 (MS2), un gène qui présente des similarités de structure avec une réductase d'acyl-CoA (Aarts et al., 1997). De même, CYP703A2, qui code pour une hydroxylase *in-chain* d'acides gras à chaîne moyenne (Morant et al., 2007), et CYP704B1, récemment décrite pour hydroxyler en *omega* les acides gras à longue chaîne (Dobritsa et al., 2009b), sont impliquées dans la biosynthèse de la sporopollénine, et apparaissent étroitement corégulées avec ACOS5. Enfin, des gènes dont l'analyse des mutants correspondants laisse supposer un rôle dans la synthèse de l'exine, mais pour lesquels l'activité enzymatique de la protéine codée n'est pas connue,



Figure R2-3. Immunoblots sur différents organes d'Arabidopsis

Les extraits de protéines solubles ont été séparés par SDS-PAGE puis analysés par western blot en utilisant des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre les différentes protéines recombinantes. Coomassie représente les protéines totales et sert de contrôle des dépôts. (A) les protéines At1g02050 (PKS-A), At4g35420 (TPR1) et At1g68540 (TPR2) ont été recherchées dans différents organes d'*Arabidopsis*. R, racines ; L, feuilles ; S, hampe florale ; FB, bourgeons floraux; Si, siliques. (B) Analyse de la présence des protéines At1g02050 (PKS-A), At4g35420 (TPR1) et At1g68540 (TPR2) au cours du développement de la fleur



Figure R2-4. Immunolocalisation des protéines At1g02050, At4g35420 et At1g68540 dans les bourgeons floraux

Immunolocalisation sur des coupes transversales de bourgeons floraux de (A) At1g02050 (PKS-A), (B) At4g35420 (TPR1) et (C) At1g68540. Les principaux stades du développement de l'anthère sont représentés, les photos de gauche étant les stades les plus jeunes. A-g, B- e et C- g sont les contrôles négatifs réalisés avec les mutants ne produisant pas la protéine recherchée. PMC, Pollen Mother Cells ; Td, tétrades ; Ms, microspores ; ta, tapétum ; P, pollen

sont également coexprimés avec *ACOS5*. C'est le cas, d'une *Strictosidine synthase like (LAP3)* (Dobritsa et al., 2009a) ou encore d'une *Dihydroflavonol Reductase like (DRL1)* (Tang et al., 2009).

Parmi les gènes corégulés, deux sont annotés comme codant des Chalcone synthase like/Polykétides synthases et plusieurs autres comme codant des oxydoréductases/deshydrogènases (parmi lesquelles *DRL1*), dont aucune n'a de substrat physiologique connu. Nous avons entrepris l'étude de plusieurs de ces gènes fortement corégulés avec *ACOS5* et dont le rôle physiologique n'est pas connu. Nous avons montré que quatre de ces gènes (*At1g02050, At4g34850, At4g35420* et *At1g68540*) étaient fortement exprimés dans le tapétum des anthères de jeunes bourgeons floraux, et que leur mutation provoque des défauts de l'exine du pollen. Les protéines recombinantes correspondantes ont été produites dans les bactéries et leurs activités catalytiques caractérisées *in vitro. At1g02050* et *At4g34850* codent pour des polykétide synthases (PKS) qui catalysent la condensation d'un ester de CoA d'acide gras avec le malonyl-CoA, pour former des trikétides ou des tétrakétides α -pyrone (Mizuuchi et al., 2008). Nous avons montré que les tétrakétides produits sont les substrats de deux réductases codées par *At4g35420* et *At1g68540*, et en conséquence, nommées Tetraketide α -Pyrone Reductases (TPR) 1 ou 2. Ainsi, deux *PKS* et deux *TPR*, exprimées dans le tapétum de l'anthère, catalysent deux étapes successives dans la biosynthèse de précurseurs de la sporopollénine, à partir d'esters de CoA d'acide gras.

II - Résultats : caractérisation de gènes impliqués dans la biosynthèse de l'exine

1/ Patron d'expression de *At1g02050*, *At4g34850*, *At4g35420* et *At1g68540* dans la plante et durant le développement floral

Nous avons effectué des recherches dans les banques de données publiques, comme Genevestigator (T. et al., 2008) ou eFP Arabidopsis Browser (Winter et al., 2007) pour déterminer l'expression des quatre gènes d'intérêt dans différents organes. Les résultats indiquent que les gènes *At1g02050*, *At4g34850*, *At4g35420* et *At1g68540* sont tous préférentiellement exprimés dans les jeunes bourgeons floraux, en accord avec le haut niveau de corégulation de leur expression. La spécificité d'expression dans les fleurs a été testée au niveau protéique pour *At1g02050*, *At4g35420* et *At1g68540* par immunoblotting, en utilisant des anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines recombinantes. Cinq organes ont été testés, et pour chacun des gènes, un signal est visible dans les bourgeons floraux, alors qu'aucun signal n'est obtenu pour les autres organes testés (**fig R2-3A**). La protéine At4g34850 n'a pas pu être détectée dans les différents organes, en l'absence d'anticorps dirigés contre elle, mais l'expression du gène correspondant est également spécifique des jeunes bourgeons floraux (C. Douglas, communication personnelle).



Figure R2-5. Analyse des mutants de At1g02050, At4g34850, At4g35420 et At1g68540

(A) représentation schématique des gènes At1g02050, At4g34850, At4g35420 et At1g68540 et des sites d'insertion du T-DNA. Les boîtes grises représentent les exons (B) Recherche par RT-PCR de la présence d'un transcrit des gènes At1g02050, At4g34850, At4g35420 et At1g68540 chez le sauvage (*wt*) et le mutant d'insertion correspondant. (C) Analyse par immunoblot de la présence des protéines At1g02050, At4g35420 et At1g68540 chez le sauvage et chez différents mutants. Le mutant du répresseur *Male Sterility1 (ms1)* surexprime les trois gènes.

Afin de déterminer le stade du développement pour lequel une accumulation des protéines était observée, nous avons réalisé des immunoblots sur des extraits de bourgeons de différents stades de développement de la fleur (**fig. R2-3B**). Pour les produits de *At1g02050* et *At1g68540*, une accumulation maximale est observée pour des bourgeons ne dépassant pas le stade 9 du développement de l'anthère, puis un signal plus faible est détecté dans les stades plus avancés, pour entièrement disparaître approximativement vers le stade 12. La protéine At4g35420 présente une cinétique différente avec une accumulation observée uniquement dans les bourgeons du stade 9 ou inférieur, et aucune accumulation dans les bourgeons plus âgés. D'une façon intéressante, les trois gènes testés présentent tous une accumulation maximale de leur protéine dans les bourgeons floraux très jeunes, dans des stades de développement de l'anthère précédant le stade 9. Inversement, SHT qui intervient dans la biosynthèse du manteau (Grienenberger et al., 2009), présente une cinétique d'accumulation plus tardive, avec un maximum dans des bourgeons plus avancés (environ au stade 11). Ces résultats suggèrent l'implication des gènes dans des processus très précoces du développement floral, probablement pour la maturation du pollen.

Pour déterminer le patron d'expression tissulaire des gènes, nous avons réalisé des marquages immunologiques sur des coupes de bourgeons floraux à différents stades de développement, en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines recombinantes (**fig. R2-4**). Très clairement, la protéine PKS-A (At1g02050) s'accumule dans le tapétum de l'anthère. Son accumulation débute en fin de phase tétrade pour continuer jusqu'au stade pollen, avec un maximum en début de stade pollen (**fig. R2-4A**). De même, la protéine TPR1 (At4g35420) est retrouvée spécifiquement dans les cellules du tapétum, mais uniquement au niveau d'anthères très jeunes, avec un maximum d'accumulation pour le stade tétrade (**fig. R2-4B**). La protéine TPR2 (At1g68540) est également spécifique du tapétum, son accumulation n'est visible qu'après le stade tétrade à partir de la libération des microspores dans le locule de l'anthère, et son accumulation tissulaire de la protéine PKS-B (At4g34850) n'a pas encore été testé par cette méthode, mais l'expression du gène est uniquement tapétale, avec un maximum au stade 8 du développement de l'anthère (stade microspore précoce) (C. Douglas, communication personnelle).

Il apparaît donc que les quatre gènes d'intérêt sont exprimés dans les très jeunes bourgeons floraux, avec des cinétiques d'accumulation des protéines légèrement différentes, et une spécificité stricte pour le tapétum, en accord avec le haut niveau de corégulation des analyses *in silico*.

2/ Sélection et analyse de mutants d'insertion

Des mutants d'insertion T-DNA pour les gènes étudiés ont été obtenus des banques de mutants (fig. R2-5A), et ont été génotypés par PCR. Le niveau d'expression des gènes chez les



Figure R2-6. Analyse phénotypique des pollens mutants

a, e, i, m, r : pollen sauvage ; b, f, j, o, s, pollen du mutant de At1g02050 (*pks-a*) ; c, g, k, p, t : pollen du mutant de At4g34850 (*pks-b*) ; d, h, l, q, u : pollen du mutant de At1g68540 (*tpr2*). a-d : pollen coloré à l'Auramine O et observé au microscope à épifluorescence. e-l : pollen observé en microscopie électronique à balayage. r-u : observation de coupes ultrafines de pollen en microscopie électronique à transmission. te, tectum ; ba, baculum. Barres pour a-l = 10 µm, barres pour m-q = 2 µm, barres pour r-u = 1 µm.

mutants homozygotes a été évalué par PCR semi quantitative à l'aide d'amorces encadrant le site d'insertion (**fig. R2-5B**), et la présence de la protéine recherchée par immunoblot (**fig. R2-5C**). Un amplicon de la taille attendue est obtenu par PCR sur les ADNc de bourgeons floraux d'une plante sauvage, alors qu'aucun transcrit n'est détecté chez le mutant correspondant. De même, les protéines, recherchées dans les bourgeons à l'aide d'anticorps spécifiques, sont retrouvées chez la plante sauvage et sont indétectables chez le mutant correspondant. Les mutants sélectionnés pour chaque gène sont donc *knock-out* (KO) avec la perte totale d'une expression fonctionnelle.

3/ Les mutants d'insertion présentent des défauts de l'exine

L'analyse du mutant de At4g35420 (drl1/tpr1) confirme les résultats précédemment obtenus (Tang et al., 2009), avec une stérilité mâle totale due à une absence de pollen mature. Le pollen des mutants d'insertion T-DNA KO des autres gènes a été analysé pour le dépôt ou le patron de l'exine, en utilisant l'Auramine O, un colorant fluorescent se fixant spécifiquement sur celle-ci. La figure **R2-6 a-d** présente les résultats obtenus en microscopie à épifluorescence pour les différents génotypes. En comparaison du sauvage, les dépôts de l'exine semblent moins importants chez les mutants pks-a et pks-b (At1g02050 et At4g34850), et le patron de l'exine apparaît perturbé. Le mutant tpr2 (At1g68540) ne semble pas affecté de façon évidente, et ne présente que des altérations subtiles de son exine par rapport au sauvage.

Afin de déterminer plus précisément leurs défauts, le pollen des mutants a été observé en microscopie électronique à balayage (fig. R2-6 e-q). Le pollen sauvage présente sa forme caractéristique, avec un patron d'exine régulier (fig. R2-6 e, i, m). Par contraste, le pollen des mutants pks-a (At1g02050) et pks-b (At4g34850) présente de sévères malformations, tant au niveau de leur forme générale que des dépôts de l'exine. Le mutant pks-a (At1g02050) a une exine plus fine et certaines parties de la paroi du pollen en sont complètement dépourvues. Néanmoins, le maillage semble peu affecté, même si les structures tectum et baculum (Cf. 3^e partie de l'introduction) apparaissent plus fines. De nombreuses protrusions sont apparentes (flèches noires), et pourraient révéler une anomalie de polymérisation de l'exine. Le mutant pks-b (At4g34850) apparaît plus affecté que le mutant *pks-a* (fig. R2-6 g, k, p). L'épaisseur de l'exine est encore plus faible, et le pollen présente de larges plages qui en sont dépourvues. Le dessin de l'exine ne semble pas affecté, mais la structure des tecta semble révéler une polymérisation incomplète et anormale, avec des dépôts irréguliers. Les grosses protrusions visibles chez *pks-a* ne sont pas présentes chez ce mutant, mais des petits dépôts entre les structures sont observés (flèches blanches) (fig. R2-6p). Le pollen du mutant tpr2 (At1g68540), observé par la même technique, présente un phénotype plus subtil, en accord avec les observations à l'Auramine O. Les structures de l'exine apparaissent légèrement plus espacées et légèrement plus fines que le sauvage (fig. R2-6 h, l, q). De même, une proportion importante du



Figure R2-7. Analyse phénotypique du double mutant pks-a/pks-b

(A et C) plante sauvage. (B et D) double mutant homozygote *pks-a/pks-b*. Contrairement au sauvage où les siliques se développent normalement, les siliques du double mutant sont avortées et ne contiennent pas de graines (flèches).



Figure R2-8. Pollen du double mutant *pks-a/pks-b*

Pollen traité à l'Auramine O et observé au microscope à épifluorescence issu d'une plante sauvage (A) ou du double mutant *pks-a/pks-b* (B). Microscopie électronique à balayage d'un grain de pollen sauvage (C) ou double mutant *pks-a/pks-b* (D), révélant l'absence totale d'exine chez le pollen mutant. Barre = $10 \mu m$.

pollen mutant comporte des anomalies de sa paroi, avec des zones où elle apparaît lisse (**fig. R2-6l**) et/ou avec des protrusions identiques à celles qui sont observées chez le mutant *pks-a* (non illustrées).

Pour visualiser l'impact de la mutation sur la structure de la paroi du pollen, des observations en microscopie électronique à transmission (MET) ont été réalisées sur des coupes ultrafines du pollen de chaque génotype. Par rapport au sauvage, la paroi pollinique du mutant *pks-a* (At1g02050) est légèrement plus fine. Les bacula sont présents mais moins épais et les tecta sont largement réduits (**fig. R2-6s**). La paroi du mutant *pks-b* (At4g34850) est très affectée, avec une épaisseur largement réduite. Les structures tectum/baculum ne sont plus visibles, et une couche épaisse et dense aux électrons semble recouvrir l'ensemble du pollen (**fig. R2-6t**). L'observation au MET du mutant *tpr2* (At1g68540) ne révèle pas d'anomalies évidentes de sa structure, avec une épaisseur identique au sauvage et des tecta/bacula normaux (**fig. R2-6u**).

4/ Le double mutant *pks-a/pks-b* est mâle stérile

Contrairement au mutant tpr l/dr l1, et malgré les malformations de leur pollen, les mutants des deux *PKS* sont fertiles. Une réduction de la fertilité est toutefois observable, avec un nombre de siliques non fécondées ou mal fécondées plus élevé que le sauvage. Les deux protéines présentent une identité de séquence de près de 80%, et nous pouvions supposer des activités enzymatiques proches et une complémentation partielle de l'une par l'autre chez chaque mutant simple. Pour vérifier cette assertion, les mutants simples *pks-a* (*At1g02050*) et *pks-b* (*At4g34850*) ont été croisés, et la génération F2 du croisement analysée afin de sélectionner les doubles homozygotes *pks-a/pks-b*. L'analyse phénotypique des lignées double homozygote révèle une stérilité totale de ces plantes (**fig. R2-7**). La fécondation manuelle du stigmate du mutant *pks-a/pks-b* avec du pollen sauvage aboutit à une production normale de graines, et indique qu'il s'agit d'une stérilité mâle. L'observation des anthères révèle l'absence quasi totale de grains de pollen mature dans les sacs polliniques (**fig R2-9D**), et les quelques grains observés après traitement à l'Auramine O ou au microscope électronique à balayage, présentent des malformations très importantes et une absence totale d'exine (**fig R2-8**).

5/ Le pollen des mutants *pks-a*, *pks-b* et *tpr2* est viable

La fertilité mâle n'est pas affectée de façon évidente chez les mutants *pks-a*, *pks-b* et *tpr2* (*At1g68540*), mais au regard des défauts observés, nous pouvions supposer une proportion plus importante de pollen non viable dans les anthères de ces mutants. Pour tester la viabilité des pollens mutants, j'ai réalisé des colorations d'Alexander sur des anthères de chaque génotype (**fig R2-9**). Étonnamment, aucun de ces trois mutants ne présentait de réduction évidente de viabilité du pollen par



Figure R2-9. Tests de viabilité de pollen d'Arabidopsis de différents génotypes.

La viabilité du pollen est révélée par le réactif d'Alexander. Le pollen au cytoplasme rose est viable. (A) anthère d'une plante sauvage, (B) anthère du mutant *pks-a*, (C) anthère du mutant *pks-b*, (D) anthère du double mutant *pks-a/pksb*, aucun grain de pollen n'est visible dans les sacs polliniques (E) anthère du mutant *drl1*, aucun grain de pollen n'est visible dans les sacs polliniques, (F) anthère du mutant *drl2*.





Les protéines sont produites par les bactéries puis purifiées par chromatographie d'affinité sur glutathion-agarose. Le tag GST est clivé puis l'ensemble est analysé sur gel de polyacrylamide. (A) étapes de purification de la protéine PKS-A purifiée par chromatographie d'affinité. a, extrait bactérien total non induit ; b, extrait bactérien total induit ; c, fraction soluble de l'extrait bactérien induit ; d, fraction insoluble de l'extrait bactérien induit ; e, protéine soluble après chromatographie d'affinité ; f, protéine purifiée après clivage de la GST. (B) analyse des différentes protéines recombinantes obtenues de la même façon que PKS-A.

rapport au sauvage, indiquant que les défauts observés n'affectent pas la survie du pollen dans ces conditions standard, du moins avant la déhiscence de l'anthère.

Cette même coloration a été effectuée sur les mutants stériles drl1 et pks-a/pks-b. Les observations révèlent l'absence totale de pollen dans les locules des anthères pour les deux mutants (fig. R29 D et E). Parfois, quelques grains sont observés dans les sacs polliniques du double mutant pks-a/pks-b, mais ceux-ci sont toujours très fortement affectés.

6/ Activités enzymatiques des protéines PKS (At1g02050 et At4g34850) et TPR (At4g35420 et At1g68540)

Les séquences codantes des deux PKS et TPR (DRL) ont été clonées dans un vecteur d'expression bactérien introduisant un tag GST Nterminal. Chaque protéine recombinante a été produite dans les bactéries et purifiée par chromatographie d'affinité (fig. R2-10) puis testée pour son activité enzymatique. En nous basant sur des activités déjà décrites pour les PKS (Mizuuchi et al., 2008), celles-ci ont dans un premier temps été incubées en présence d'esters de CoA d'acides gras C16:0, C17:0 ou C18:0 issus d'une synthèse chimique, et de malonyl-CoA. L'incubation avec chaque PKS aboutit à la formation d'un trikétide α -pyrone et d'un tétrakétide α -pyrone correspondant à l'acyle-CoA substrat, et identifiés par spectrométrie de masse (fig. R2-11 A, C et D)). Le triketide α pyrone est issu de l'addition de 4 atomes de carbone venant de la condensation de 2 malonyl-CoA, et le tétrakétide de l'addition de 6 carbones venant de 3 malonyl-CoA (fig. R2-11B). L'incubation aboutit à la synthèse de trikétide, et de façon plus minoritaire de tétrakétide, en accord avec les activités décrites. Quand on fournit à la PKS un ester de CoA d'acide gras qui a été obtenu par voie enzymatique, en incubant ACOS5 en présence d'acide gras et de coenzyme A, les résultats sont sensiblement différents : de façon intéressante, ces incubations ont abouti à la synthèse majoritaire de tétrakétide par rapport au trikétide, donc dans des proportions inverses à celles observées avec l'ester de CoA chimique (fig. R2-11Aa).

Pour compléter ces résultats, et en nous basant sur la présence d'acides gras insaturés et hydroxylés dans la sporopollénine, des acides gras hydroxylés ou insaturés ont été testés comme substrats. L'ester de CoA de l'acide gras correspondant a été obtenu enzymatiquement, lors d'une préincubation avec ACOS5. Pour chaque ester de CoA formé, les tri et tétrakétides correspondants ont été obtenus après l'action de l'une ou l'autre des PKS. Cependant, la catalyse des acides gras saturés ou hydroxylés aboutit majoritairement à la synthèse du tétrakétide, alors que le trikétide est principalement formé avec les acides gras insaturés pour substrat (**fig R2-11A b et c**).

L'analyse des séquences de At4g35420 (TPR1/DRL1) et At1g68540 (TPR2) indique que les deux protéines codées présentent une identité de 64%, chacune possédant un site de fixation du

А





Figure R2-11. Analyse des activités enzymatiques des PKS et TPR

(A) analyse par chromatographie en couche mince des produits radiomarqués issus de la catalyse de PKS-A et PKS-B. L'enzyme recombinante produite chez les bactéries, est incubée avec un ester de CoA d'acide gras (indiqué en haut de la piste) et du ¹⁴C-Malonyl-CoA. Les produits de réaction sont séparés sur plaque de silice. Palmitoyl-CoA1 correspond à un ester issu de la catalyse de ACOS5, palmitoyl-CoA2 est issu d'une synthèse chimique. Le blanc correspond à une incubation sans ester de CoA d'acide gras. (B) Formation de trikétide et tétrakétide α -pyrones par PKS-A ou PKS-B. (C) analyse par LC-MS des produits de réaction des PKS. Les incubations ont été réalisées avec du heptadécanoyl-CoA (C17-CoA) et du malonyl-CoA comme substrats. Les masses [M-H]⁻ correspondant aux tri- et tétra-kétides sont recherchées par spectrométrie de masse en mode Selected Ion Recording (SIR). (D) patron de fragmentation par Collision Ion Dissociation (CID) en mode négatif des produits des PKS et schéma hypothétique de fragmentation des polykétides. (E) analyse par LC-MS des produits de réaction des TPR. En fin d'incubation des PKS, TPR1 et/ou TPR2 sont ajoutés dans le milieu réactionnel avec du NADPH. Les masses [M-H] correspondant aux tri- et tétrakétides et leurs équivalents réduits ou doublement réduits (+ 2 amu et + 4 amu), sont recherchées par spectrométrie de masse en Selected Ion Recording (SIR). (F) patron de fragmentation par Collision Ion Dissociation (CID) en mode négatif d'un tétrakétide (M = 378 Da) (a) et de son équivalent réduit (M = 380) (b), et schémas de fragmentation hypothétiques. (G) réaction de réduction hypothétique par TPR1 et TPR2 de la cétone de la chaîne latérale en alcool secondaire.







PKS

PKS				TPR				
Gene name	Species	Expression	reference	Gene name	Species	Expression	reference	
AtPKS-A	Arabidopsis thaliana	tapetum	this work	AtTPR2	Arabidopsis thaliana	tapetum	this work	
AtPKS-B	Arabidopsis thaliana	tapetum	this work	AtTPR1	Arabidopsis thaliana	tapetum	Tang et <i>al.,</i> 2008	
OsYY2	Oriza sativa	tapetum	Hihara et <i>al.,</i> 1996	OsDFR2	Oryza sativa	tapetum	Yau et <i>al</i> . 2005	
SICHSL	Silene latifolia	tapetum	Ageez et <i>al.,</i> 2005	Rice	Oryza sativa	tapetum	Huang et <i>al.</i> , 2009	
BnCHSL1	Brassica napus	tapetum	Shen and Hsu, 1992					
NsCHSL	Nicotiana sylvestris	tapetum	Atanassov et al., 1998					
PrCHSL	Pinus radiata	tapetum	Walden et <i>al.,</i> 1999					
TaCHSL1	Triticum aestivum	tapetum	Wu et <i>al.,</i> 2008					

0.2

. CR

CCR Clade

Figure R2-12. Analyse phylogénétique des PKS et des TPR

TPR2 Clade

Arbre phylogénétique des PKS (A) et TPR (B) utilisant les séquences protéiques d'Arabidopsis et une sélection d'homologues de différentes espèces. Les gènes connus par la littérature ou les banques d'EST pour leur expression dans le tapétum, les anthères ou les bourgeons floraux, sont indiqués en gras. Pour comparaison, les CHS, les DFR et les CCR de quelques espèces ont été ajoutées (C) Gènes homologues aux PKS ou aux TPR d'Arabidopsis, dont l'expression spécifique du tapétum a été décrite dans la littérature.

NADP/NAD, suggérant une activité du type réductase. Ainsi, et prenant aussi en compte la corégulation des gènes avec *PKS-A* et *PKS-B*, nous avons testé la capacité des réductases putatives à réduire les produits des PKS. Comme montré dans la **figure R2-11E**, lorsque l'une ou l'autre des protéines recombinantes est ajoutée au milieu d'incubation des PKS, en présence de NADPH, le pic correspondant au tétrakétide ($[M-H]^- = 377$ amu) diminue ou disparaît, et un nouveau pic apparaît avec une valeur *m/z* de 2 amu plus élevée. La même incubation réalisée en absence de NADPH, n'aboutit à la production d'aucun nouveau pic. Ces résultats démontrent que les deux réductases sont actives sur les tétrakétides α -pyrones qu'elles sont capables de réduire, alors qu'elles ne sont pas actives sur le trikétide.

La métabolisation des tétraketides par TPR1 ou TPR2 aboutit à un produit dont le temps de rétention en LC est identique, et l'incubation simultanée du tétrakétide avec à la fois TPR1 et TPR2, n'aboutit pas à la production d'un composé doublement réduit (+ 4 amu). Ces résultats suggèrent une cible de réduction identique des tétrakétides pour TPR1 et TPR2.

La différence structurale majeure entre le tri et le tétrakétide α -pyrone consiste en la présence d'une fonction cétone sur la chaîne latérale du tétrakétide (**fig. R2-11B**), faisant de cette fonction la cible la plus probable des réductases. La fragmentation de tétrakétide non réduit ou réduit par Collision Ion Dissociation (CID) et l'analyse de son spectre de masse fait état de la présence d'un ion fils de m/z = 125 amu. Cet ion est caractéristique du cycle lactone chez le tétrakétide (Saxena et al., 2003; Rubin-Pitel et al., 2008), et apparaît non affecté par la réduction (**fig. R2-11F**). En se basant sur ces résultats, il semble très probable que les TPR réduisent la cétone des tétrakétides α -pyrones en alcool secondaire. En conséquence, nous proposons le nom de *Tetraketide* α -Pyrone Reductases1 (*TPR1*) et *Tetraketide* α -Pyrone Reductases2 (*TPR2*), pour *Att4g35420* et *At1g68540* respectivement.

7/ Analyse phylogénétique des PKS et TPR

PKS-A et PKS-B, comme la Chalcone Synthase (CHS) ou la Stilbène Synthase (STS) appartiennent à la famille des polykétides synthases de type III. Des études antérieures avaient montré la conservation de ces gènes chez les bactéries, les champignons et les plantes (Mizuuchi et al., 2008; Atanassov et al., 1998). La présence de deux PKS coexprimées dans les fleurs d'*Arabidopsis* nous a poussé à voir ce qu'il en était chez d'autres espèces de plantes. Nous avons cherché les homologues les plus proches de chaque gène dans différentes espèces dont la mousse *Physcomitrella*. Les séquences disponibles dans les banques d'EST, de cDNA ou des génomes séquencés, nous ont permis de construire un arbre phylogénétique avec les séquences protéiques (**fig. R2-12A**). Pour comparaison avec des références établies, nous avons inclus les véritables Chalcone synthase d'*Arabidopsis* et de quelques autres espèces. De cette analyse, il ressort que les PKS-A et PKS-B d'*Arabidopsis* se

retrouvent dans des clades différents, clairement distincts de celui des CHS. Chacun de ces clades se divise en deux sous clades, regroupant respectivement les membres des monocotylédones et des dicotylédones. De façon intéressante, en plus d'*Arabidopsis*, d'autres espèces, comme le peuplier, le riz, le maïs ou *Ricinus*, présentent également deux membres qui se répartissent dans chaque clade défini par PKS-A et PKS-B. Plusieurs de ces gènes ont déjà été décrits dans la littérature pour leur expression dans le tapétum (**fig. R2-12C**), ou sont retrouvés dans des banques d'EST spécifiques des anthères ou des bourgeons floraux. Un homologue proche des PKS d'*Arabidopsis* est également retrouvé chez la mousse *Physcomitrella*.

Il est à noter qu'il existe un homologue d'*Arabidopsis* très proche de PKS-A et nommé PKS-C. Celui-ci ne présente pas la même spécificité d'expression dans les bourgeons floraux, et de façon surprenante, la protéine recombinante ne possède pas la même activité que PKS-A et B (non illustré). L'analyse en microscopie du pollen mutant *pks-c* ne révèle aucun défaut de l'exine (non illustré), il apparaît donc que ce gène n'a pas la même fonction que PKS-A et PKS-B d'*Arabidopsis*.

Ainsi, la présence d'orthologues putatifs aux PKS-A et B, largement distribués dans le règne végétal, de la mousse aux plantes supérieures, suggère une fonction ancienne et conservée au cours de l'évolution, associée a chaque PKS.

Les TPR appartiennent à une superfamille de gènes incluant des membres de mammifères, de bactéries ou de végétaux (Lacombe et al., 1997). Peu de choses sont connues concernant les gènes de plantes, et sont référés comme codant des *DFR-likes (DRL)*, sur la base de leur homologie avec la *DFR (TT3)* impliquée dans la synthèse des anthocyanines. L'analyse phylogénétique révèle également la présence d'homologues conservés se regroupant avec chacune des TPR et formant deux nouveaux clades clairement distincts des clades regroupant les vraies DFR et CCR (**fig. R2-12B**). Ces homologues sont retrouvés de la mousse *Physcomitrella* aux Angiospermes, et de façon intéressante, plusieurs espèces possèdent un membre dans chacun des nouveaux clades, comme le riz, la tomate, le peuplier ou *Physcomitrella* par exemple. De même, la littérature ou les banques d'EST indiquent une expression de la plupart des gènes dans le tapétum ou les organes mâles de la fleur (**fig. R2-12C**).

Ainsi, des homologues conservés de *TPR-1* et *-2* existent dans l'ensemble du règne végétal, et la présence d'un homologue de chaque *TPR* chez *Physcomitrella* indique la présence ancienne de deux formes de *TPR* chez les plantes.

L'ensemble de ces analyses phylogénétiques suggère l'acquisition et la conservation par les plantes terrestres d'une voie de synthèse impliquant les PKS et les TPR et aboutissant à la synthèse de précurseurs de la sporopollénine.



Figure D2-1. Analyse phylogénétique des PKS du type III de plantes et de bactéries D'après Mizuuchi et al. 2008.

Chapitre 2. Discussion et Perspectives

La structure et la composition de la sporopollénine, principal constituant de l'exine, reste encore largement inconnue. Les analyses chimiques (Ahlers et al., 2003; Dominguez et al., 1999) et génétiques, associées aux études biochimiques (de Azevedo Souza et al., 2009; Morant et al., 2007) ont démontré la présence d'unités lipidiques et phénoliques dans le polymère de la sporopollénine. D'un autre côté, l'isolement de nombreux mutants affectés dans la synthèse de l'exine a montré le grand nombre de gènes participant à la formation de la paroi du pollen, et a mis à jour le haut degré de complexité de ce processus. Nous avons pu montrer l'implication de quatre nouvelles enzymes, agissant en aval de la CoA ligase ACOS5 qui produit des esters de CoA d'acides gras. Deux des gènes codent pour des polykétides synthases, PKS-A et PKS-B, chacune produisant des trikétides et des tétrakétides α -pyrone par condensation décarboxylative d'esters de CoA d'acides gras et de malonyl-CoA. Nous avons identifié deux réductases, TPR1 et TPR2, qui sont actives sur les tétrakétides α pyrone produits, en créant une nouvelle fonction hydroxyl qui pourrait intervenir dans les liaisons esters ou éthers lors de la polymérisation de la sporopollénine, comme cela a été proposé pour les fonctions hydroxyls introduites par les CYP450 (Morant et al., 2007; Dobritsa et al., 2009b). Ainsi, ces données révèlent pour la première fois la participation d'unités polykétides comme précurseurs de la sporopollénine, et ajoutent une fonction supplémentaire à cette classe de composés naturels, déjà connue pour leur remarquable diversité fonctionnelle chez les végétaux.

Les polykétides constituent une classe de composés naturels particulièrement large et variée, incluant des pyrones, des acridones, des chalcones, des stilbènes ou encore des phloroglucinols (Austin and Noel, 2003; Flores-Sanchez and Verpoorte, 2009). Ils sont synthétisés par des polykétides synthases (PKS) réparties par classe de type I, II ou III, sur la base de leur structure. Les polykétide synthases de type I et II sont de larges complexes multienzymatiques, alors que celles du type III sont homodimériques. Les PKS du type III sont retrouvées chez les plantes, les champignons et les bactéries, et catalysent la condensation d'une variété d'acyles esters de CoA avec un nombre variable d'unités de malonyl-CoA (Mizuuchi et al., 2008). Les PKS III les plus étudiées chez les plantes sont les Chalcone Synthases (CHS) et les Stilbènes Synthases (STS), qui catalysent la condensation du pcoumaroyl-CoA avec trois unités malonyl-CoA pour former un intermédiaire tétrakétide identique, qui subit ensuite une cyclisation différente pour former la chalcone ou le stilbène. Les CHS sont ubiquitaires chez les plantes, et les STS qui ne sont retrouvées que chez certaines espèces ne sont pas distinguables des CHS au niveau de leur séquence. De façon intéressante, les plantes possèdent d'autres PKS du type III qui, comme les PKS-A, B et C d'Arabidopsis, sont distinctes des CHS/STS et phylogénétiquement proches de PKS décrites chez les bactéries, et produisant des lipides phénoliques (fig. D2-1).
Nous avons pu montrer le rôle critique des *PKS-A* et *PKS-B* dans le développement du pollen et particulièrement dans la synthèse de sa paroi. Les mutants simples de chaque PKS présentent des modifications importantes de l'exine de leur pollen, mais demeurent fertiles, alors que le double mutant *pks-a/pks-b* ne produit plus de pollen, et en conséquence présente une stérilité mâle. Ces résultats révèlent la redondance des fonctions de chaque PKS, qui sont capables de se complémenter partiellement. Cependant, le pollen reste largement affecté chez les mutants simples et ceci indique qu'une seule des PKS n'est pas suffisante pour assurer la fonction des deux gènes. Il pourrait s'agir d'un effet de niveau d'expression, avec la nécessité d'une expression fonctionnelle de chaque locus pour aboutir à une activité enzymatique suffisante. Plus probablement, ce résultat révèle des fonctions chevauchantes mais distinctes de chaque PKS, qui ne peuvent pas s'expliquer par nos données biochimiques. Ainsi, une affinité différentielle pour des substrats, une régulation temporelle légèrement différente ou une localisation subcellulaire distincte des protéines, pourrait expliquer l'acquisition et la conservation de deux gènes proches chez les plantes au cours de l'évolution.

Concernant les autres gènes impliqués dans la synthèse de la sporopollénine, leur mutation touche différemment la fertilité de la plante. Ainsi, la mutation des deux hydroxylases *Cyp703A2* et *Cyp704B1* conduit à une stérilité partielle, alors que les mutants *acos5* et *tpr1/dr11* ne forment plus de pollen et sont totalement stériles. Au contraire, le mutant *tpr2* apparaît complètement fertile et ne présente que de légères perturbations de son exine. L'impact différentiel des mutations de *TPR1* (*DRL1*) et *TPR2* sur le développement du pollen est surprenant et ne peut pas être anticipé au vu des données biochimiques. *In vitro* les deux protéines présentent une activité de réduction similaire des tétrakétides α -pyrones produites par les PKS, avec une efficacité proche. Les résultats génétiques suggèrent des fonctions *in planta* suffisamment différentes des deux gènes, expliquant que *TPR2* ne puisse pas complémenter la défection de *TPR1* par redondance fonctionnelle. Nous avons montré des cinétiques d'accumulation des protéines différentes entre TPR1 et TPR2. *TPR1* est exprimé plus tôt que *TPR2* est lui détecté jusqu'au stade 12. Cette cinétique différentielle pourrait expliquer la différence des fonctions associées à chaque gène, même si elles sont supportées par une activité enzymatique identique.

La résistance remarquable de la paroi du pollen vis-à-vis de stress biotiques ou abiotiques est probablement une des clés de la colonisation par les plantes des milieux terrestres. La présence de la sporopollénine, dans la paroi du pollen des plantes à fleur et des Gymnospermes, ainsi que dans la paroi des spores des mousses, des fougères ou des bactéries, révèle la conservation au cours de l'évolution d'une ancienne voie de biosynthèse. De façon cohérente, la conservation s'observe aussi pour les éléments génétiques participant à la synthèse de la sporopollénine. Les gènes d'*Arabidopsis* décrits pour y participer, comme les deux hydroxylases, *CYP703A2* et *CYP704B1*, ou encore *ACOS5*, possèdent des homologues conservés chez de nombreuses plantes, particulièrement chez les



Figure D2-2. Implication des lipides phénoliques pour l'encystement de *A. vinelandii* Coupes d'un cyste de *A. vinelandii* sauvage (A) et du mutant *arsB* :: *aphhII* (B) observées au microscope électronique à transmission. Le « Central Body » (CB) est entouré d'une paroi externe (exine) et d'une couche interne (intine). Barre = $0.5 \mu m$. D'après Funa et al., 2006.

Angiospermes et les Gymnospermes mais également chez la mousse *Physcomitrella patens*. Dans ce contexte, il apparaît cohérent que les deux *PKS* et les deux *TPR* d'*Arabidopsis* soient également très conservés chez l'ensemble des plantes terrestres, dont la mousse *Physcomitrella patens*. De façon remarquable, la majorité des homologues de PKS et TPR trouvés chez d'autres espèces s'expriment dans les fleurs, les anthères ou le tapétum. Ces homologues sont donc très probablement les orthologues des PKS et des TPR décrites dans ce manuscrit, avec une activité catalytique et une fonction identique chez ces plantes.

L'analyse des deux gènes de PKS et TPR révèle une conservation partielle de leur structure, notamment par la présence d'introns et d'exons identiques à chaque couple. Cette observation suggère la duplication des gènes au cours de l'évolution, puis l'acquisition de fonctions différentes (paralogie). De façon intéressante, les analyses phylogénétiques révèlent la conservation des paralogues de PKS et de TPR, chez de nombreuses autres espèces qu'*Arabidopsis*, indiquant l'importance pour les plantes de posséder deux gènes proches de PKS et TPR. Pour les PKS, la duplication est observée chez les monocotylédones et les dicotylédones, mais ne s'observe pas pour *Physcomitrella* ou pour le Gymnosperme *Pinus radiata*, qui possèdent une seule copie de chaque gène (**fig. R2-12**). Inversement, deux TPR sont déjà présentes chez la mousse *Physcomitrella*, indiquant l'ancienneté et la conservation des fonctions portées par chaque TPR.

Il est intéressant de noter que le métabolisme étudié ici, n'est pas strictement associé à la protection du gamétophyte mâle chez les plantes. La présence des éléments génétiques connus de cette synthèse chez la mousse *Physcomitrella* suggère leur implication dans la synthèse de l'exine de la spore et donc leur fonction dans la protection du sporophyte. La fonction de ce métabolisme apparaît ainsi encore plus large, et associée de façon générale à la reproduction sexuée des plantes terrestres. Cependant, les analyses chimiques de la spore bactérienne (cyste) révèlent une composition de leur été caractérisées chez la bactérie *Azotobacter vinelandii*, qui catalysent la synthèse d'alkylrésorcinoles et de tri et tétrakétides similaires à ceux produits par AtPKS-A et AtPKS-B. De façon remarquable, l'exine de la spore bactérienne est fortement affectée chez la souche mutante pour ces gènes (**fig. D2-2**), suggérant l'implication de ces gènes dans la synthèse de l'exine bactérienne (Funa et al., 2006). Ainsi, la conservation de ces mécanismes biochimiques s'observe des bactéries aux plantes supérieures, et de façon intéressante, l'exine reste associée à une fonction unique de protection, établissant un parallèle biosynthétique et structural entre la spore bactérienne, la spore végétale et le grain de pollen.

Les travaux décrits dans ce manuscrit mettent clairement à jour l'implication des PKS et des TPR dans la synthèse des précurseurs de la sporopollénine, et révèlent des événements catalytiques originaux de cette synthèse. Ces résultats, associés aux résultats antérieurs ayant décrit l'implication



Figure D2-3. Voie de biosynthèse hypothétique des monomères de sporopollénine.

Schéma hypothétique indiquant une séquence catalytique potentielle, impliquant les enzymes caractérisées pour participer à la synthèse de la sporopollénine (en gras), ou supposées impliquées dans cette même synthèse. Dans ce modèle, les hydroxylases (Cyp703A2 et Cyp704B1) agissent sur les esters de CoA d'acide gras, aboutissant, après action de PKS et de TPR, à un lipide phénolique multihydroxylé, pouvant éventuellement être modifié par d'autres enzymes. Ces composés constitueraient des monomères majeurs incorporés dans le polymère de la sporopollénine.

de ACOS5, CYP704B1 et CYP703A2 dans la biosynthèse de la sporopollénine (de Azevedo Souza et al., 2009; Dobritsa et al., 2009b; Morant et al., 2007), permettent de proposer une séquence catalytique incluant chacun des acteurs caractérisés (**fig. D2-3**). La caractérisation des PKS révèle toutefois la participation inédite de lipides phénoliques dans la composition de la sporopollénine. De plus, l'absence totale de sporopollénine chez le double mutant *pks-a/pks-b* révèle un flux métabolique unique ayant recours à la catalyse des PKS, et indique que le lipide phénolique, modifié ou non par d'autres enzymes, est le monomère majeur de la sporopollénine.

Cependant, la faible spécificité des PKS pour leur substrat *in vitro* ne permet pas d'en déduire leur(s) substrat(s) physiologique(s) exact(s). De nombreuses interrogations subsistent quant à la longueur de la chaîne de l'acide gras mis en jeu, ou de son degré d'hydroxylation ou d'insaturation. De même, la séquence catalytique reste floue. Par exemple, il est possible que les hydroxylases décrites pour leur participation dans cette synthèse (CYP703A2 et CYP704B1), agissent *in planta* sur le lipide phénolique eux-mêmes ou encore sur les esters de CoA, et non pas sur les acides gras libres, comme cela a été décrit (Morant et al., 2007; Dobritsa et al., 2009b) (**fig. D2-3**). Pour mieux appréhender la séquence biosynthétique exacte, il serait intéressant de connaître la nature des produits intermédiaires de cette synthèse en réalisant des analyses métaboliques. À cet égard, l'analyse des mutants de synthèse pouvant accumuler ces intermédiaires, serait particulièrement utile. La suite de ces travaux devra donc principalement être axée sur la comparaison des profils métaboliques des bourgeons floraux de plantes sauvages ou dérégulées pour un ou plusieurs gènes. Pour cela, il est nécessaire que les composés soient solubles et qu'ils s'accumulent dans la plante, et nos premières tentatives n'ont pas permis de mettre à jour des perturbations métaboliques nettes liées aux mutations.

L'implication de nouveaux acteurs de cette synthèse devra également être recherchée. L'analyse de corégulation avec ACOS5 nous a permis de sélectionner les PKS et les TPR, mais d'autres gènes présentaient une corégulation forte avec ACOS5 (fig. R2-2). C'est le cas de plusieurs « Lipid Transfer Proteins » (LTP), d'une oxydoréductase (ATA1) ou encore d'un gène nommé « Tapetum Specific Protein Related » (TSP-like) du fait de sa similarité avec une protéine spécifique du tapétum. Les LTP sont de petites protéines, connues pour fixer des lipides ou des acyles-CoA, et participer à leur transport au travers des membranes. Elles constituent donc de bonnes candidates pour le transport d'unités monomériques de la sporopollénine, du tapétum vers la microspore (fig. D2-3). Leur rôle dans ce processus biologique serait donc particulièrement intéressant à étudier. Cependant, il n'existe pas de mutant d'insertion dans les collections pour ces gènes, et la présence de plusieurs gènes LTP corégulés fait craindre des difficultés liées aux redondances fonctionnelles.

L'identification de l'oxydoréductase *Arabidopsis Tapetum1 (ATA1, At3g42960)* est issue d'un crible de gènes de la fleur et sa spécificité d'expression pour le tapétum a été démontrée par hybridation *in situ* (Wellmer et al., 2004). La protéine possède des similarités avec la « *short chain deshydrogenase » TASSELSEED* du maïs, et pourrait donc participer à un métabolisme lipidique. De



Figure D2-4. Analyse de la paroi pollinique de pollen sauvage d'*Arabidopsis* et des mutants *ata1* et *cyp 703A2*

Coloration à l'Auramine O et observation en microscopie à épifluorescence de pollen sauvage (A), du mutant *ata1* (B et C) et du mutant *cyp703A2* (D). Le mutant *ata1* produit des pollens aux phénotypes très différents : une proportion présente des dépôts d'exine très réduits (B), tandis qu'une proportion identique apparaît normale (C). Barres = $10 \mu m$.



Figure D2-5. Analyse de la paroi pollinique de pollen sauvage et du mutant tspr

Coloration à l'Auramine O et observations en microscopie à épifluorescence de pollen sauvage (A), et du mutant *tapetum specific protein related (tspr)*. Des modifications du patron de l'exine sont observées (B). Des observation en microscopie électronique à transmission sur des coupes ultrafines de pollen sauvage (C) et du mutant *tspr* (D), ne révèlent pas de modifications de la structure de la paroi du pollen chez le mutant par rapport au sauvage.

plus, la recherche de séquences homologues dans les banques d'ADN révèle une bonne conservation chez l'ensemble des plantes terrestres. Ce gène pourrait donc constituer un autre acteur de la voie de synthèse de la sporopollénine. L'analyse du mutant *ata1* est resté préliminaire et a abouti à des résultats contradictoires. Une nette réduction de la quantité d'exine est observée sur certains grains de pollen, rappellant d'autres mutants de synthèse de la sporopollénine (comme *cyp703A2*). Cependant, de façon inexpliquée, de nombreux autres grains apparaissent normaux (**fig. D2-4**). Ces contradictions devront être éclaircies, et la relation exacte du phénotype avec la mutation *ata1* vérifiée. Néanmoins ce gène semble un bon candidat pour une intervention dans la biosynthèse de la sporopollénine.

Le gène de la « *Tapetum Specific Protein Related* » (*TSPR, At4g20420*) code pour une petite protéine (142 aa, 15 kDa), et ne présente aucune similarité avec un gène connu. Sa petite taille semble exclure une activité catalytique. De façon inattendue, l'analyse du pollen du mutant correspondant révèle une perturbation importante du dépôt de l'exine (**fig. D2-5 A et B**). Le maillage régulier de l'exine observé chez le sauvage n'est plus observé pour le mutant, et les analyses en microscopie électronique à transmission montrent que la structure des tecta et bacula, ainsi que l'épaisseur de l'exine ne sont pas affectées (**fig. D2-5 C et D**). Le gène semble donc intervenir dans la définition du patron de l'exine. Cette découverte est surprenante, cette fonction étant généralement associée à des gènes gamétophytiques. Encore une fois, il pourrait être extrêmement intéressant d'étudier les mécanismes par lesquels une petite protéine du tapétum détermine l'organisation spatiale des dépôts de l'exine sur le grain de pollen.

Chapitre 3

Recherche de fonctions de transférases BAHD par une approche génomique et métabolique



Figure R3-1. Voie de synthèse hypothétique des glucosinolates du type 3benzoyloxypropylglucosinolate dans les graines d'*Arabidopsis*.

Les enzymes synthétisant le Benzoyl-CoA et l'hydroxypropyl glucosinolate pour la synthèse de benzoyloxypropylglucosinolate ont été caractérisées. Une dernière étape est nécessaire, et fait potentiellement intervenir une acyltransférase BAHD. D'après Kliebenstein et al., 2007.

Chapitre 3. Recherche de fonctions de transférases BAHD par une approche génomique et métabolique

I – Introduction

Les résultats obtenus pour *SHT* ont permis de valider le type d'approche utilisé, qui allie des approches génomiques et métaboliques pour l'étude des gènes catalytiques. La précision, la fiabilité et la diversification des outils issus de l'analyse du génome d'*Arabidopsis*, permettent aujourd'hui de les intégrer à part entière dans la démarche expérimentale aboutissant à l'analyse fonctionnelle d'un gène.

L'utilisation de ces outils dans le cadre de l'étude des métabolismes secondaires peut se traduire de différentes manières. Elle peut l'être par l'étude de la corégulation des gènes, qui, dans certains cas, est particulièrement efficace pour déterminer les partenaires d'une voie de synthèse. Son utilisation a été illustrée dans ce manuscrit lors de l'étude de *SHT* et des *PKS* et *TPR*. Une autre approche possible consiste à superposer un patron d'expression d'un gène avec la localisation spatiale et temporelle d'un métabolisme connu ou d'un processus physiologique donné. Ainsi, par exemple, les gènes impliqués dans la biosynthèse du manteau et de la paroi du pollen présentent une expression spécifique des bourgeons floraux. Ce profil est observé pour *SHT*, les *PKS* et les *TPR*, ainsi que pour tous les autres gènes connus pour participer à ce processus (*CYP703A2*, *CYP704B1*, *ACOS5*, ...). Nous pouvons donc supposer que, si d'autres gènes participent à la biosynthèse de la paroi du pollen, leur expression est spécifique des jeunes bourgeons floraux. En nous basant sur cette hypothèse, nous nous sommes servi des patrons d'expression issus des puces à ADN pour établir une sélection de gènes présentant une profil compatible. Cette même approche peut être généralisée pour n'importe quel métabolisme présentant une spécificité spatio-temporelle caractéristique.

II – Résultats : Analyse de BAHD d'*Arabidopsis* exprimées dans les graines et les bourgeons floraux

1/ Quelques pistes pour la recherche de fonction

Nos connaissances associées aux données de la littérature nous ont amenés à nous intéresser à des métabolismes ou des processus physiologiques faisant potentiellement intervenir une acyltransférase BAHD.



Figure R3-2. Patrons d'expression pour une sélection d'acyltransférases BAHD.

Les patrons d'expression sont issus des données des puces à ADN publiques. La coloration rouge représente l'expression maximale relative. La couleur jaune représente une expression indétectable dans l'organe considéré. Les couleurs intermédiaires représentent une expression intermédiaire du gène considéré. (A) exemple de planche représentant les organes testés telle qu'elle est présentée par le serveur eFP Browser (http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi) pour le gène *SHT*. (B) idem pour le gène *At5g41040*. (C) Détail du profil d'expression au cours du développement floral pour certaines BAHD. (D) Détail du profil d'expression au cours du développement de la graine pour des BAHD choisies.

Ainsi, prenant en considération la présence probable d'hydoxycinnamates estérifiés à des acides gras dans la paroi du pollen et se basant sur la capacité des acyltransférases BAHD de réaliser ce type de réaction, nous avons supposé l'intervention d'une acyltransférase BAHD dans la synthèse de la paroi pollinique, pour l'incorporation des unités phénylpropanoïdes.

De même, la caractérisation récente d'enzymes impliquées dans la synthèse de glucosinolates a permis de définir une voie de synthèse hypothétique, dans laquelle une acyltransférase encore inconnue catalyserait le transfert d'un groupement benzoyl sur un hydroxypropylglucosinolate dans la graine. Cette acyltransférase utilisant un Benzoyl-CoA, il est possible qu'il s'agisse d'une BAHD (Kliebenstein et al., 2007) (**fig. R3-1**).

Dans un autre contexte, une analyse métabolique récente de la graine d'*Arabidopsis* fait état de la présence de conjugués disinapoyl spermidine. Sur la base de l'activité hydroxycinnamoyl-spermidine transférase de SHT dans les bourgeons que nous venions de mettre à jour, nous avons supposé l'intervention d'une autre acyltransférase BAHD pour la synthèse de ce composé spécifique de la graine d'*Arabidopsis* (Bottcher et al., 2008).

2/ Sélection de BAHD par un crible de l'expression spatiale des gènes

Nous nous sommes donc intéressés à ces métabolismes, ou processus physiologiques particuliers, parce qu'ils font potentiellement intervenir une acyltransférase BAHD et qu'ils présentent une spécificité spatiale caractéristique. Les gènes impliqués dans la synthèse des glucosinolates de la graine, comme ceux impliqués dans le biosynthèse du conjugué de spermidine de la graine présentent probablement une expression spécifique de la graine. De même que le gène d'une acyltransférase impliquée dans la synthèse de la paroi du pollen devrait être exprimé dans les jeunes bougeons floraux. Sur la base de cette hypothèse, nous avons entrepris une analyse exhaustive de l'expression des BAHD putatives d'*Arabidopsis*, en utilisant les données publiques des puces à ADN, pour sélectionner les gènes de BAHD spécifiquement exprimés, soit dans les graines, soit dans les bourgeons floraux d'*Arabidopsis*.

Les recherches d'expression spatiales ont principalement été faites sur le serveur eFP Browser (Winter et al., 2007) ou Genevestigator (T. et al., 2008), et par ce crible, quatre BAHD putatives spécifiquement exprimées dans les graines et quatre autres, spécifiquement exprimées dans les bourgeons floraux (incluant *SHT*) ont été sélectionnées (**fig R3-2**). Grâce aux banques publiques de mutants d'*Arabidopsis*, et pour chaque gène sélectionné, nous avons obtenu un ou plusieurs allèles de mutant, qui ont été génotypés par PCR pour sélectionner les individus homozygotes pour l'insertion.





(A) Séparation chromatographique d'un extrait méthanolique de graine d'*Arabidopsis* et analyse de l'absorbance (220 - 500 nm). Les composés P1 (disinapoyl-hexose spermidine) et P2 (disinapoyl spermidine) sont indiqués par une flèche. (B) Séparation similaire à (A), mais couplée avec analyse en spectrométrie de masse (Selected Ion Recording), par la recherche des masses de P1 (disinapoyl-hexose spermidine ; 719 Da en vert) et P2 (disinapoyl spermidine ; 557 Da en rouge). (C) Structures des conjugués de spermidine.



Figure R3-4. Recherche de disinapoyl spermidine dans les graines d'*Arabidospsis* sauvages et de différents mutants de BAHD

Analyse en spectrométrie de masse de la présence d'un composé de masse 719 et 557 correspondant la masse des conjugués de spermidine des graines d'*Arabidopsis*. Les graines sauvages et de différents mutants d'insertion ont été analysées. (A) graine sauvage, (B), (C), (D), (E) correspondent aux analyses respectives de mutants des gènes *At541040*, *At1g13840*, *At2g23510* et *At5g63560*. Le mutant de *At2g23510* est caractérisé par l'absence des deux dérivés de spermidine.

3/ Analyse des gènes BAHD spécifiquement exprimés dans les graines

a/ La graine d'Arabidopsis accumule des conjugués disinapoyl-spermidines

Afin de vérifier la présence effective de conjugués de spermidine dans les graines d'*Arabidopsis*, tel que cela avait été reporté par l'analyse du métabolome de la graine (Bottcher et al., 2008), les phénols solubles des graines d'*Arabidopsis* sauvage ont été extraits au méthanol/eau et analysés par LC-MS/MS. L'analyse par spectrométrie de masse révèle la présence de composés ayant la masse moléculaire attendue pour les conjugués de spermidine (557 Da pour le disinapoyl spermidine et 719 pour le disinapoyl-hexose spermidine) (**fig. R3-3**). L'analyse de leur spectre UV (λ max = 330 nm) et de la fragmentation de la molécule en spectrométrie de masse suggère fortement que les pics nommés P1 et P2 sont effectivement des sinapoyl-spermidines. Pour voir si d'autres conjugués de spermidine di ou tri acylée avec le cinnamate, le coumarate, le caféate, le férulate, l'hydroxyférulate ou le sinapate ont également été recherchées dans les graines d'*Arabidopsis*. Aucun de ces produits, excepté le disinapoyl-spermidine, n'a été détecté par spectrométrie de masse.

b/ Le mutant de At2g23510 n'accumule plus les conjugués de spermidine

Afin de déterminer si l'un des quatre gènes de BAHD exprimé dans la graine est impliqué dans la synthèse des conjugués de spermidine, les graines des mutants correspondants et d'une plante sauvage ont été extraites dans les mêmes conditions, puis analysées en LC-MS. Trois des quatre mutants (*At5g63560*, *At5g41040* et *At4g13840*) ne présentent pas de différences d'accumulation des conjugués de spermidine, qui sont retrouvés dans des proportions identiques à celles des graines sauvages (**fig. R3-4**). Inversement, l'analyse des graines du mutant de *At2g23510* révèle l'absence totale des conjugués de spermidine (**fig. R3-4**), suggérant l'implication de ce gène dans la biosynthèse de ces composés.

L'accumulation d'un éventuel intermédiaire de synthèse chez le mutant à été recherchée. La masse d'un monosinapoyl spermidine et d'un monosinapoyl-hexose spermidine a été recherchée dans les extraits des graines du mutant, sans révéler leur présence. Ces résultats suggèrent que les deux acylations de la spermidine sont catalysées par le produit du gène *At2g23510*, avant l'intervention d'une glycosyltransférase inconnue.

c/ Suite de l'analyse de At2g23510

Suite à la découverte de l'implication probable de At2g23510 dans la synthèse des deux conjugués de spermidine de la graine d'*Arabidopsis*, nous avons entrepris l'étude de l'expression de ce gène dans la plante en réalisant le clonage du promoteur contrôlant le gène rapporteur GUS et, pour valider l'activité enzymatique de la protéine, nous avons entrepris la production de la protéine recombinante dans les bactéries. Au cours de ces clonages, Luo et *al.* (2009) ont publié la caractérisation de ce gène (Luo et al., 2009). L'acyltransférase, nommée Spermidine Disinapoyl Transférase (SDT) a été montrée capable de catalyser le double transfert d'un sinapoyl sur la spermidine *in vitro*, pour former la N₁, N₁₀, disinapoyl spermidine. La réaction reverse peut également être catalysée par cette enzyme, en produisant le sinapoyl-CoA et la spermidine à partir de la disinapoyl spermidine. Le gène correspondant est exprimé dans les graines en maturation et également lors des premiers stades de la germination de la graine. La majeure partie de la caractérisation de ce gène ayant été décrite, nous n'avons pas poussé plus loin son analyse.

d/ Les gènes At5g41040 et At5g63560 ne sont pas impliqués dans la synthèse de glucosinolates de la graine

La proximité des gènes At5g41040 et At5g63560 avec ceux du clade E dans l'arbre phylogénétique des BAHD indiquait que ceux-ci pouvaient être impliqués dans le transfert d'un benzoyl-CoA, nécessaire à la synthèse d'un glucosinolate de la graine (fig. R3-1) (Kliebenstein et al., 2007). Les glucosinolates des graines des mutants correspondants ainsi que d'une plante sauvage ont été extraits, désulfatés puis analysés par LC-MS. Les deux glucosinolates majeurs de la graine d'Arabidopsis (3-BZO et 4-BZO) sont retrouvés dans les extraits des graines de la plante sauvage, mais également dans celles des graines des deux mutants (non illustré). Les protéines At5g41040 et At5g63560 présentant entre elles une identité de 66%, associé à un patron d'expression proche, nous pouvions supposer la complémentation d'une des protéines par l'autre chez les mutants simples. Le croisement des mutants simples, pour obtenir le double mutant a donc été entrepris. Celui-ci a été obtenu, malgré la difficulté résultant de la proximité génétique des deux loci. Cependant, au cours de ce travail, le gène At5g41040 a été caractérisé et son implication dans la synthèse de subérine aromatique, par le transfert du feruloyl sur un acide gras hydroxylé, a été démontré par deux équipes (Molina et al., 2009; Gou et al., 2009). Ce gène n'est donc pas impliqué dans la synthèse d'un glucosinolate, et probablement pas non plus At5g63560 qui devrait présenter une activité proche. Le double mutant reste toutefois un outil précieux pour appréhender la fonction encore inconnue de At5g63560 dans un autre métabolisme.



Figure R3-5. Analyse phénotypique de pollen d'Arabidopsis sauvage et de différents mutants

Le pollen d'*Arabidopsis* sauvage (A) ou des mutants de *At4g29250* (B), *At3g23840* (C) et *At1g03390* (D) sont analysés au macroscope. Les flèches indiquent des malformations. En (B), les grains de pollen sont en tétrades en raison d'une seconde mutation (*quartet 3*). Barre = 30 μ m.

4/ Analyse des gènes BAHD spécifiquement exprimés dans les bourgeons floraux

a/ Les mutants des gènes At3g23840 et At4g29250 ne présentent pas de phénotype, le mutant de At1g03390 présente un phénotype subtil

En première analyse, et du fait de l'expression des gènes sélectionnés dans les bourgeons floraux, nous nous sommes intéressés à la fertilité des plantes mutantes pour les gènes At1g03390, At3g23840 et At4g29250. En comparaison avec la plante sauvage, aucun des trois mutants ne présentait de réduction évidente de fertilité, avec dans l'ensemble une fécondation normale, aboutissant à une production de graines identique à celle du sauvage (non illustré).

Nous avons porté notre attention sur les caractéristiques du pollen des mutants, dans l'hypothèse d'une intervention des gènes correspondants dans la synthèse de la paroi du pollen. Ceuxci ont été déposés sur une lame de microscope et observés sans traitement au macroscope (Leica MacroFluo). Le pollen sauvage présente sa forme caractéristique avec une quasi-totalité de pollen sans anomalies (**fig. R3-5A**). Le pollen du mutant *At4g29250*, issu de la collection SAIL est dans un fond génétique *quartet* (*qrt*) (Preuss et al., 1993) qui aboutit à la libération d'un pollen en tétrade. Un autre allèle, issu de la collection SALK dans un fond génétique Col-0, ne présente pas le phénotype *quartet* (non illustré), et l'analyse du pollen ne révèle pas de malformations évidentes de sa structure (**fig. R3-5B**). De même, le mutant de *At3g23840* apparaît normal, avec une structure semblable à celle du sauvage (**fig. R3-5C**). De façon intéressante, le pollen du mutant *At1g03390* présente un phénotype subtil, avec une majorité du pollen dont la forme générale est légèrement affectée (**fig. R3-5D**).

b/ Les mutants des gènes exprimés dans les bourgeons floraux ne présentent pas de chémotype

Les métabolites solubles des bourgeons floraux des plantes mutantes et sauvages ont été extraits au méthanol/eau et analysés en LC-MS. L'analyse des chromatogrammes en absorbance ou dans les deux modes d'ionisation (Total Ion Current, positif et négatif), ne révèle pas d'accumulation différentielle d'un métabolite chez le mutant en comparaison du sauvage (non illustré). Il s'avère donc que ces gènes ne sont pas impliqués dans la synthèse d'un métabolite soluble s'accumulant dans les bourgeons floraux.





Vue partielle de l'arbre phylogénétique dans lequel se distribuent les BAHD *At1g03390*, *At4g29250* et *At3g23840* (en rouge) exprimées dans les bourgeons floraux d'*Arabidopsis*. Les BAHD caractérisées sont indiquées en noir. Les produits formés ou les biosynthèses touchées chez les mutants sont présentés pour certaines d'entre elles.

c/ Contexte phylogénétique des BAHD exprimées dans les bourgeons floraux

L'analyse de la distribution des BAHD exprimées dans les bourgeons dans l'arbre phylogénétique révèle la répartition de ces protéines dans deux clades différents (**fig. R3-6**). Les protéines At3g23840 et At4g29250 se retrouvent dans le clade contenant CER2 d'*Arabidopsis* et Glossy2 du maïs, toutes deux impliquées dans l'élongation des cires épicuticulaires par un processus biochimique inconnu. La fonction des enzymes de ce clade apparaît conservée des monocotylédones aux dicotylédones, et il semble probable que les BAHD putatives qui s'y retrouvent interviennent dans un processus biochimique proche. De plus, les mutants *cer3* et *cer6*, qui présentent un phénotype identique à *cer2* avec une réduction de cires épicuticulaires, ont été caractérisés pour leur implication dans la synthèse du manteau pollinique (Ariizumi et al., 2003; Preuss et al., 1993). Prenant en compte l'activité la plus probable de ces BAHD, ainsi que la spécificité de l'expression des gènes correspondants, At3g23840 et At4g29250 semblent de bons candidats pour la métabolisation des acides gras à très longues chaînes du manteau pollinique.

La troisième BAHD putative exprimée dans les bourgeons (*At1g03390*), se trouve proche du clade E, spécifique du transfert de phénols sur différents accepteurs, dans le même clade que At5g41040 (Aliphatic Suberin Feruloyl Transferase, ASFT) impliqué dans le transfert d'un phénol sur un acide gras pour la synthèse de la subérine (Molina et al., 2009; Gou et al., 2009), et non loin du clade contenant SDT et SCT synthétisant respectivement la disinapoyl spermidine et la dicoumaroyl spermidine (**fig. R3-6**). Le transfert d'un acide hydroxycinnamique apparaît donc conservé pour les enzymes proches de At1g03390. Cette BAHD putative pourrait donc être impliquée dans ce même type de transfert. De plus, ASFT (At5g41040), la BAHD d'*Arabidopsis* la plus proche de At1g03390 (66% d'identité), possède l'activité Hydroxy-acide gras Hydroxycinnamoyl Transférase supposée également nécessaire à la synthèse de la sporopollénine. Ainsi, le contexte phylogénétique de cette BAHD et sa spécificité d'expression suggèrent son implication probable dans la synthèse de la sporopollénine, par l'incorporation d'unités phénols.

d/ Expression tissulaire de At4g29250

Afin d'appréhender la fonction du gène *At4g29250* dans les bourgeons floraux d'*Arabidopsis*, son expression tissulaire a été déterminée en utilisant le gène rapporteur GUS. Les 2 kb précédant l'ATG initiateur du gène ont été clonés en amont de la séquence codante de la GUS et le plasmide résultant utilisé pour transformer *Arabidopsis*. L'analyse des lignées transgéniques confirme l'absence d'expression dans les feuilles et les tiges et révèle une expression dans les anthères de la fleur (non illustré). Pour déterminer la localisation de l'expression du gène au niveau tissulaire, des bourgeons floraux ont été inclus dans de la paraffine puis coupés transversalement. L'observation de ces coupes



Figure R3-7. Analyse de l'expression de *At4g29250* par le gène rapporteur GUS

Coupes transversales de bourgeons floraux après coloration histochimique GUS des plantes pAt4g29250 :: GUS. (A), coupe transversale d'un bourgeon entier. (B) et (C), coupes transversales d'anthères. ta, tapétum ; P, grain de pollen.

révèle un signal restreint aux cellules du tapétum et dans certains cas, aux grains de pollen (**fig. R3-7**). Le signal commence à être visible à des stades tardifs du développement de l'anthère (vers le stade 11 et 12), pendant le passage de la microspore vers le grain de pollen. La coloration disparaît avant la dégénérescence des cellules du tapétum. Le gène présente donc une expression spatiale restreinte aux cellules du tapétum et au gamétophyte mâle pendant les stades tardifs de la maturation du pollen.

5/ Utilisation du mutant *male sterility1 (ms1*) comme révélateur de l'implication de gènes dans la synthèse de la paroi/manteau du pollen

Lors de la caractérisation de *SHT*, nous avions mis à jour le rôle d'activateur que jouait le facteur de transcription putatif Male Sterility1 (MS1) sur son expression. Chez le mutant *ms1*, l'expression de *SHT* est nulle, et la protéine n'est plus détectée dans les bourgeons floraux. *MS1* a été largement décrit, et serait un régulateur transcriptionnel de gènes impliqués dans la maturation du pollen (Ito et al., 2007; Ito and Shinozaki, 2002; Vizcay-Barrena and Wilson, 2006; Wilson et al., 2001; Yang et al., 2007). Son expression est restreinte aux cellules du tapétum, son action est donc limitée à la régulation de gènes exprimés dans ce type cellulaire. *ms1* peut donc servir de marqueur pour prédire l'expression tapétale de certains gènes : si une régulation différentielle est observée entre le sauvage et *ms1*, il est probable que le gène considéré soit, pour le moins, exprimé dans le tapétum.

L'analyse du mutant *ms1* permet également un autre niveau de prédiction. L'analyse des TPR et PKS révèle une suraccumulation des protéines chez le mutant *ms1*, indiquant le rôle répresseur de MS1 pour ces gènes dans la plante sauvage. Il apparaît donc qu'au cours de la maturation du pollen, MS1 agit dans un premier temps comme répresseur de l'expression de gènes, et dans un second temps comme activateur de l'expression d'autres. Les quatre gènes *PKS* et *TPR* participent à la synthèse de la paroi du pollen, sont exprimés précocement et sont réprimés par MS1. *SHT*, *TSM*, *Cyp98A8* et *Cyp98A9*, sont impliqués dans la synthèse du manteau pollinique, sont exprimés plus tardivement et sont activés par MS1 (**fig. R3-8**). Les différentes étapes aboutissant à la formation de la paroi/manteau du pollen sont donc strictement régulées par des mécanismes moléculaires, et se succédant dans le temps. Cette régulation différentielle peut donc être mise à profit pour prédire l'implication d'un gène dans un processus précoce ou tardif de la formation de la paroi du pollen, *id es* l'implication dans la synthèse de la paroi ou du manteau.

Cette prédiction est fortement facilitée par la disponibilité d'expériences de microarray comparatives entre *ms1* et le sauvage. Ainsi pour chaque gène d'*Arabidopsis*, son expression chez *ms1* est disponible dans les serveurs publics de microarray. Pour valider l'approche, chaque gène connu pour participer à la synthèse de l'exine, comme chaque gène connu pour son implication dans la synthèse du manteau a été analysé pour sa dérégulation chez le mutant *ms1* (**fig. R3-8**). Tous les gènes participant à la synthèse de l'exine sont fortement surexprimés chez le mutant *ms1*. Inversement, les





(A) analyse par immunoblot de l'accumulation de protéines PKS-A, TPR-1 et -2 et SHT dans les bourgeons floraux de plantes sauvages et du mutant *male sterility1 (ms1)*. (B) Analyse transcriptionnelle du mutant *ms1*. L'expression dans les bourgeons floraux de gènes impliqués dans la synthèse de la paroi et du manteau du pollen est analysée chez le mutant *male sterility1 (ms1)* en comparaison du sauvage. Le vert indique une expression réduite chez le mutant, le rouge une expression supérieure. Données Genevestigator (Hruz T. et al., 2008).

gènes connus pour être exprimés dans le tapétum et pour participer à la synthèse du manteau pollinique, comme *SHT*, sont fortement réprimés chez *ms1*. Le gène *HCT*, qui est exprimé dans les anthères, mais qui n'intervient pas dans ces processus est utilisé comme contrôle et son expression n'apparaît pas modifiée chez *ms1*. Il semble donc bien exister une régulation différentielle de gènes par MS1, en fonction de leur implication dans un processus, ou un stade particulier du développement du pollen.

Si on s'intéresse à la dérégulation des trois gènes des BAHD putatives d'*Arabidopsis* exprimés dans les bourgeons chez le mutant *ms1*, la consultation des données transcriptionnelles fait état d'une forte diminution de l'expression pour le gène *At4g29250*. Son expression est modifiée en accord avec sa localisation dans le tapétum et sa répression suggère son implication dans la biosynthèse du manteau, en accord avec une activité enzymatique supposée dans la biosynthèse de lipides du manteau.

L'expression de *At3g23840* n'est pas modifiée chez *ms1*, suggérant qu'elle n'a pas lieu dans le tapétum ou qu'elle n'est pas impliquée dans la biogenèse de la paroi/manteau pollinique.

Enfin, le gène *At1g03390*, comme *ACOS5*, les *PKS* et les *TPR*, est surexprimé chez le mutant *ms1*, pouvant indiquer son implication dans la biosynthèse de l'exine/sporopollénine.

Chapitre 3. Discussion et Perspectives

Notre approche expérimentale allie les données dérivant de la connaissance des génomes et la génétique classique et inverse dans le cadre de l'étude du métabolisme secondaire. Elle établit une relation métabolisme/enzyme sur la base d'une localisation spatiale et temporelle concordante de l'accumulation du métabolite et de l'expression du gène, et repose largement sur la disponibilité des données de puces à ADN dans les banques publiques. Cette stratégie est cependant dépendante de prérequis importants, tels que la sélection préalable de gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme ciblé, et la nécessité d'une spécificité spatio-temporelle caractéristique de celui-ci. À cet égard, le métabolisme secondaire est particulièrement adapté à cette approche.

Dans notre cas, nous cherchions à associer une activité acyltransférase à un métabolisme, la sélection s'est donc faite sur la base d'indices suggérant son implication dans une voie métabolique. Les métabolismes sélectionnés étaient soit spécifiques de la graine, soit spécifiques des bourgeons floraux, ils présentaient donc une spécificité spatiale caractéristique qui nous permettait d'associer aisément un patron d'expression présentant les mêmes caractéristiques.

Par ce type d'approche, nous avons identifié l'acyltransférase BAHD intervenant dans la synthèse de disinapoyl spermidines dans la graine, validant dans ce cas la stratégie utilisée. Cependant, nous n'avons pas été à même d'identifier l'acyltransférase impliquée dans le métabolisme des glucosinolates. Il est cependant possible que cette réaction soit catalysée par une transférase autre qu'une BAHD ou que son patron d'expression ne soit pas strictement spécifique de la graine.

L'étude des acyltransférases exprimées dans les bourgeons est toujours en cours. At3g23840 et At4g29250 présentent des similarités importantes avec les protéines CER2 d'*Arabidopsis* et Glossy 2 du maïs, dont les mutants correspondants sont affectés dans la synthèse des cires épicuticulaires (**fig. R3-6**). Les mécanismes biochimiques ne sont pas connus, mais les deux BAHD putatives pourraient êtres impliquées dans des processus similaires, en produisant des acides gras à très longue chaîne.

La BAHD *At4g29250* est exprimée dans les cellules du tapétum, à un stade assez tardif du développement du pollen. Sa cinétique d'expression est similaire à celle de *SHT*, et sa répression chez le mutant *ms1* suggère son implication dans la biosynthèse du manteau pollinique. Ceci est en accord avec la présence d'acides gras à très longue chaîne dans le manteau, et At4g29250 apparaît un bon candidat pour une implication dans leur synthèse.

Le pollen du mutant d'insertion de *At4g29250* ne présente pas de phénotype évident, cependant une implication dans la synthèse du manteau n'est pas à exclure, sachant que de nombreux mutants de gènes impliqués dans ce processus (dont *cer3* et *cer6*) ne présentent pas de phénotype dans les conditions normales de culture. Pour appréhender l'action de At4g29250 dans la biosynthèse de lipides du manteau, il faudra réaliser des analyses métaboliques comparatives des lipides constitutifs du manteau, entre du pollen sauvage et muté, ou éventuellement réaliser une analyse en microscopie électronique à transmission, après coloration à l'acétate d'uranyle. Cependant la découverte du

métabolite affecté chez le mutant ne permettrait pas encore de déterminer l'activité enzymatique de la BAHD, sachant que les autres membres du clade agissent dans la synthèse des cires via des activités biochimiques inconnues.

At3g23840, la seconde BAHD putative exprimée dans les bourgeons se retrouve aussi dans le clade défini par CER2 (**fig. R3-6**), suggérant également une implication dans la biosynthèse de cires. Sa localisation tissulaire n'a pas été analysée, son expression dans le tapétum et son implication dans un processus de synthèse de la paroi du pollen n'est pas certaine. Son expression n'est pas affectée chez le mutant *ms1*, suggérant son expression ailleurs que dans le tapétum, comme par exemple la microspore ou les organes femelles de la fleur. Le mutant d'insertion du gène ne présente pas de phénotype évident, son activité n'apparaît donc pas essentielle à la plante dans nos conditions de culture.

Pour son étude, la localisation précise de l'expression du gène devra être déterminée, puis des analyses de lipides pourraient permettre de définir plus clairement la fonction de *At3g23840* dans les bourgeons floraux.

Le gène *At1g03390* est proche d'autres acyltransférases impliquées dans le transfert d'acides hydroxycinnamiques dans l'arbre phylogénétique des BAHD (**fig. R3-6**). Chez *Arabidopsis*, il est l'homologue le plus proche de *ASFT* (*At5g41040*) récemment caractérisée pour son activité féruloyl 16-hydroxypalmitate transférase, impliquée dans la biosynthèse de la subérine. Il est donc probable que le produit du gène *At1g03390* présente une activité proche.

La biochimie analytique a établi la présence de groupements phénylpropanoïdes (coumarate et férulate) dans la sporopollénine. Les lipides phénoliques produits par les PKS présentent plusieurs fonctions hydroxyles qui pourraient être estérifiées par un phénylpropanoïde. Ce type de réaction pourrait être catalysé par une acyltransférase utilisant un hydroxycinnamoyl-CoA comme donneur d'acyle, et ce type d'activité serait proche de celle de ASFT.

Le gène *At1g03390* est exprimé précocement dans les bourgeons floraux, présente une corégulation élevée avec *ACOS5*, et sa surexpression chez le mutant *ms1* suggère son expression dans le tapétum et son implication dans la biosynthèse de l'exine. De plus, le pollen du mutant correspondant présente un phénotype visible (**fig. R3-5**). Ces résultats, associés au contexte phylogénétique, font de ce gène un acteur probable de la biosynthèse de l'exine par l'incorporation d'unités phénols dans la sporopollénine.

La suite de l'étude devra porter sur l'analyse précise du phénotype du pollen, par des observations au microscope électronique à balayage, par exemple. L'activité de la protéine recombinante sera testée en utilisant un hydroxycinnamoyl-CoA comme donneur d'acyle, et des accepteurs lipidiques comme par exemple le lipide phénolique produit par les PKS/TPR.

Conclusion générale

Les aléas et les hasards de la recherche expérimentale m'ont mené vers l'étude de deux métabolismes différents et de plusieurs familles de gènes impliqués dans le développement du pollen d'*Arabidopsis thaliana*. Par ces travaux, nous avons mis à jour la voie de synthèse des phénolamides du pollen, et révélé un aspect inédit de la synthèse de sporopollénine, dans la composition de laquelle l'implication de lipides du type α -pyrone est décrite pour le première fois. Ces résultats apportent, dans l'ensemble, leur contribution à la compréhension des processus complexes menant à la formation du gamétophyte mâle chez *Arabidopsis*.

Mais au-delà du simple intérêt d'assigner une fonction à de nouveaux gènes, nos résultats illustrent de façon intéressante deux des rôles majeurs associés au pollen, qui sont la protection de l'élément mobile de la reproduction sexuée et sa contribution à la compétitivité inter/intraspécifique et à la spéciation. Ces rôles reposent en grande partie sur le métabolisme secondaire, mais s'appuient sur une plasticité métabolique contradictoire. La protection du pollen est critique, puisqu'elle conditionne la pérennité de l'espèce. L'acquisition du métabolisme de la sporopollénine, qui aboutit au biopolymère le plus résistant connu, apparaît comme une condition obligatoire à la reproduction sexuée des plantes terrestres ; il n'existe pas d'exemple d'un gamétophyte mâle d'une plante terrestre qui n'ait recours à l'exine pour sa protection. Comme toutes les fonctions essentielles, sa conservation est remarquable, et s'illustre parfaitement par la conservation observée chez les acteurs de la synthèse de sporopollénine.

D'un autre côté, le pollen joue un rôle particulier dans la compétitivité intra et interspécifique et dans la spéciation, notamment en définissant les conditions de l'interfécondité. Cette fonction est particulièrement assurée par les gènes impliqués dans la reproduction sexuée, et repose sur une évolution accélérée de ceux-ci. En ce sens, l'acquisition récente et rapide de la voie des phénolamides du pollen par *Arabidopsis*, dont le rôle n'apparaît pas essentiel mais qui contribue probablement à avantager l'espèce, illustre parfaitement comment une plasticité métabolique importante peut être le moteur de la compétitivité, donc de la survie, des espèces dans leur environnement.

Ainsi, et d'une façon générale, il est intéressant de voir comment l'étude de voies de synthèses spécifiques du métabolisme secondaire peut s'intégrer dans un contexte plus global, et participe à la compréhension de mécanismes fondamentaux de la biologie.

Matériel & Méthodes

Matériel & Méthodes

I – Préparation de l'ADN

1/ Amplification des fragments d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Cette technique permet l'amplification exponentielle de fragments d'ADN (Sambrook et al., 1989). L'amplification se fait *in vitro* grâce à l'utilisation d'ADN polymérases thermostables optimisées, dérivées de l'ADN polymérase de la bactérie Thermus brockianus et de deux amorces oligonucléotidiques capables de s'hybrider à des régions flanquant la séquence à amplifier. Les amorces peuvent porter à leur extrémité 5' des séquences additionnelles correspondant à des sites de restriction. L'ajout de ces sites permet l'insertion ultérieure des fragments PCR dans le vecteur de clonage. Les conditions générales de l'amplification selon les polymérases utilisées sont :

	Génotypage et cri : Utilisation du Pron	iblage de colonies I Kit GoTaq de néga	Clonage : Utilisation du Kit Phusion Master Mix de FinnZymes	
	Volumes pour 20 µL de réaction	Concentration/ quantité finale	Volumes pour 20 µL de réaction	Concentration/ quantité finale
Matrice d'ADN	2 μL	150 ng	2 µL	150 ng
Oligo sens (100 µM)	0.1 μL	0.5 μM	0.1 μL	0.5 µM
Oligo antisens (100 µM)	0.1 μL	0.5 μM	0.1 μL	0.5 µM
MgCl ₂ (25 mM)	2 μL	2.5 mM	Phusion Master Mix 2x 10 μL	
dNTP (10 mM)	2μL	1 mM		
Tampon x5	4 μL	1x		
ADN polymérase	0.1 μL	1 U		
eau	qsp 20 μL		qsp 20 μL	

La réaction de PCR se déroule selon les conditions générales suivantes :

	GoTaq Criblage de colonies	GoTaq Génotypage	Phusion Master Mix Clonage des CDS	
Dénaturation	4 min à 95°C	2 min à 95°C	2 min à 98°C	_
Dénaturation	10 sec à 95°C	30 sec à 95°C	10 sec à 98°C	Cycle répété n fois en
Hybridation	10 sec à Tm	30 sec à Tm	10 sec à Tm + 3°C	considérée
Elongation	72°C ,1 min par kb			consideree
Elongation finale		72°C ,2 min p	ar kb	

L'hybridation se fait à une température Tm calculée en fonction du nombre de paires A/T et G/C de l'amorce selon la formule :

Tm = 69,3 + 0,41 x (% GC) - (650 / taille de l'amorce en bases)

L'étape d'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier et du type de polymérase utilisé (1kb/min en moyenne). Pour une amplification optimale des fragments d'ADN, 25 à 30 cycles de PCR sont généralement suffisants.

2/ Purification phénol/chloroforme du fragment de PCR

Un volume de réaction de PCR est mélangé vigoureusement avec un volume de phénol/chloroforme (1/1; v/v) afin de séparer les protéines et les acides nucléiques. Une centrifugation de 5 min à 10 000 rpm permet de séparer la phase organique contenant les protéines de la phase aqueuse contenant les acides nucléiques. Cette phase est récupérée et traitée avec un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24 volumes pour 1 volume), vortexée et centrifugée comme précédemment. La phase aqueuse est à nouveau récupérée et additionnée de 2,5 volumes d'éthanol ainsi que de 150 mM de NaCl qui permettra à l'ADN de précipiter. L'ensemble est vortexé et placé à -20°C sur une période de 30 min à toute une nuit. L'ADN précipité est récupéré après centrifugation 20 min à 10 000 rpm et lavé dans un volume d'éthanol 70%. Le culot obtenu après centrifugation 10 min à 10 000 rpm est séché puis repris dans 20 µL d'eau stérile.

3/ Digestion de l'ADN par des endonucléases de restriction et déphosphorylation du vecteur

Les enzymes de restriction coupent les molécules d'ADN (produits de PCR et vecteurs) au niveau de sites de reconnaissance spécifiques, et génèrent des fragments à extrémités cohésives 5' ou 3' sortantes ou à extrémités franches. Chaque endonucléase présente une activité optimale à une température donnée dans un tampon spécifique. La digestion d'1 µg d'ADN se fait en général pendant une incubation de deux heures à 37°C en présence de une à trois unités d'enzyme, selon l'enzyme. Dans le cas de doubles digestions, les conditions, notamment le tampon, sont choisies pour être optimales pour l'activité des deux enzymes. Un quart d'heure avant la fin de la digestion, le vecteur est traité à la phosphatase alcaline (CIP 0,2 U pour 1 mg d'ADN) qui déphosphoryle les groupements 5' phosphate libres, empêchant ultérieurement la ligation du vecteur sur lui-même.

4/ Analyse des fragments d'ADN digérés sur gel d'agarose et purification

Les fragments d'ADN obtenus par digestion enzymatique sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose pur dont le pourcentage (0,8 à 2%) varie selon la taille des fragments à analyser. Une partie ou l'ensemble de l'ADN encore présent dans la solution de digestion, est mis en suspension dans le tampon de charge (Tris-HCl 2 mM pH8, EDTA 10 mM, saccharose 5%, bleu de bromophénol 0,01%). L'ensemble est déposé sur un gel préparé dans du tampon TAE 1x ou 0,5x (1x : Tris-base / acide acétique glacial 40 mM pH 8, EDTA 1 mM). Après électrophorèse à 100 volts dans le tampon

TAE (0,5-1x), le gel est immergé dans un bain de Bromure d'Ethidium (BET) à 0,5 µg/ml pendant 10 min. Les fragments sont analysés sous lumière UV. Les bandes de gel contenant les fragments d'ADN que l'on désire isoler sont découpées, puis purifiée à l'aide du kit *NucleoSpin extract* (Macherey-Nagel), ou le reste d'ADN de la digestion est purifié par extraction phénol/chloroforme.

5/ Ligation rapide de l'insert et du vecteur

Le vecteur et l'insert purifiés sont ligués grâce à la T4 DNA ligase qui catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités libres 3' hydroxyle et 5' phosphate des molécules d'ADN. La ligation s'effectue 10 min à température ambiante (20-25°C) à l'aide du kit *Rapid DNA ligation* (Fermentas). Le milieu réactionnel (20 µL final) contient environ 50 ng de vecteur et environ 150 ng d'insert dans le tampon de ligation du kit en présence de 5 U de T4 DNA ligase.

II - Clonages

1/ Souches bactériennes

E. coli DH5a (endA1 hsdR17 (r_k - m_k +) supE44 thi-1 recA1gyrA (Nalr) relA1 Δ (lacZYA-argF)U169 (\emptyset 80dlac Δ (lacZ)M15))

Cette souche bactérienne ne contient aucun plasmide, ce qui limite les évènements de recombinaison impliquant un plasmide d'intérêt nouvellement intégré. Elle est donc fréquemment utilisée pour amplifier un plasmide recombinant.

E. coli BL21-G612 (F ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B m_B) λ (DE3) pLysS(cm^R)

La déficience de cette souche pour deux protéases (ompT et lon) favorise la production des différentes protéines d'intérêt à partir d'un vecteur d'expression. Cette bactérie synthétise également un ARN de transfert possédant le codon arginine. Cet ARNt est très faiblement exprimé chez les procaryotes alors qu'il est très fréquemment retrouvé chez les eucaryotes (triplet AGA).

2/ Vecteurs

a/ Vecteur de sous clonage

Le sous clonage de fragments de PCR a été réalisé dans le vecteur pGEM-T en se servant du kit « PGEM-T Easy Vector System » (Promega).

Le plasmide pGEM-T a une taille de 3 kb et porte le gène de résistance à l'ampicilline. Il est ouvert et porte à chaque extrémité 3' un T simple brin capable de s'hybrider avec un A simple brin présent à l'extrémité 5' du produit de PCR. Le gène $LacZ\alpha$ nécessaire à l' α -complémentation du gène



Figure M-1. Représentation schématique des vecteurs de clonage.

(A) pGEX-KG, vecteur de surexpression bactérien d'un ADNc fusionné à la GST. (B) pBin61, vecteur de surexpression *in planta*. (C) pBi101, vecteur contenant le gène GUS pour l'étude de promoteur. (D) pFGC5941, vecteur pour l'expression d'un ARN double brin en épingle à cheveux (1^{er} polylinker pour le clonage sens, 2nd polylinker pour le clonage antisens).

de la β -galactosidase est interrompu par le polylinker, permettant une sélection blanc/bleu des bactéries en présence du substrat de la β -galactosidase (X-gal).

b/ Vecteur d'expression chez E. coli

Le vecteur pGEX-KG (Pharmacia) est un plasmide de 5 kb possédant un gène de résistance à l'ampicilline afin de sélectionner les bactéries transformées. Une séquence codant la Glutathion S-transférase (GST) se trouve en amont de la cassette de clonage, afin de produire une fusion GST-Protéine d'intérêt. Un promoteur *tac* permet d'activer l'expression de ce gène, et donc la production de la protéine, par les bactéries *E.coli* BL21-G612 après une induction par l'IPTG. Il est alors possible de purifier la protéine d'intérêt grâce à l'affinité de la partie GST pour le glutathion. Un site de clivage de la thrombine, situé juste après la séquence codant la GST permet finalement de libérer la protéine d'intérêt (**fig. M-1A**).

c/ Vecteur de surexpression chez Arabidopsis

Le vecteur pBin61 est un vecteur binaire dérivé du pBin19 (**fig. M-1B**). Ce vecteur de 12-13 kb possède 2 origines de réplication fonctionnant dans *A. tumefaciens* et *E. coli* respectivement, et les séquences bordantes du plasmide Ti d'*A. tumefaciens*. Le vecteur pBin61 possède une cassette de clonage située dans le T-DNA et flanquée du promoteur 35S du CaMV et du terminateur nos de la nopaline synthase.

d/ Vecteur d'étude du promoteur

Le vecteur pBi101 (Clontech) dérive également du vecteur binaire pBin19 (**fig. M-1C**). Il permet d'étudier l'activité d'un promoteur chez les plantes par l'expression du gène β -glucuronidase (*GUS*). En effet, dans le T-DNA de ce vecteur, le gène *GUS* se trouve en aval du polylinker et en amont du signal de polyadenylation du gène de la nopaline synthase (*nos*).

e/ Vecteur pour le RNAi

Le vecteur binaire pFGC5941 contient deux polylinkers afin de cloner en orientation sens et antisens un fragment du gène d'intérêt (**fig. M-1D**). Entre les séquences sens et antisens du gène d'intérêt est présente la séquence de l'intron de la chalcone synthase de *Petunia hybrida*. Cette construction exprimée sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV permet la formation d'ARN double brin en épingle à cheveux, déclencheur du silencing du gène d'intérêt.

III - Méthodes de clonage

L'ensemble des tampons et milieux ainsi que les techniques de base sont décrits dans l'ouvrage de référence de J. Sambrook (Sambrook and Russel, 2001). Les digestions et les ligations des fragments d'ADN ont été réalisées conformément aux recommandations des fabricants.

IV - Méthodes de transformation

1/ Transformations bactériennes

La souche d'*E. coli DH5* α a été préparée soit pour l'électroporation soit pour la transformation par choc thermique. Les souches d'*E. coli BL21-G612* et *A. tumefaciens* sont exclusivement électrotransformées.

a/ Transformation par choc thermique

Préparation des bactéries

Afin de pouvoir intégrer un plasmide, les bactéries utilisées doivent être préalablement rendues compétentes. Le traitement consiste à perméabiliser les membranes bactériennes grâce à une combinaison de DMSO (DiMéthyle SulfOxide) et de calcium. Des colonies fraîches de bactéries sont mises à pousser sous agitation vigoureuse à température ambiante dans 200 mL de milieu SOB. Lorsque la densité optique (D.O.) de la culture atteint 0,45 (pour $\lambda = 600$ nm), la prolifération des cellules est stoppée en plaçant les bactéries dans la glace (10 min). La culture est ensuite centrifugée (2 500 g, 15 min) à température ambiante et le culot est lavé à deux reprises dans 64 mL de tampon HTB froid (4 °C). Le culot de cellule est repris dans 16 mL de tampon HTB auquel sont ajoutés 1,2 mL de DMSO. Les bactéries compétentes sont alors aliquotées, congelées dans l'azote liquide et conservées à - 80 °C jusqu'à utilisation.

Milieu SOBBacto-tryptone 20 g/L ; Bacto-yeast extract 5 g/L ; NaCl 0,5 g/L, KCl 250 mM ; ajusté à pH 7
avec du NaOH ; additionné après autoclavage de MgCl₂ 10 mM et MgSO₄ 10mM.Tampon
HTBTampon Hépès 10 mM ; CaCl₂ 15 mM ; KCl 250 mM ; H2O, ajusté à pH 6,7 avec du KOH ;
MnCl₂ 55 mM ; stérilisé par filtration sur membrane Millipore 0,22 μm

Choc thermique : Le mélange de ligation (10 μ l) est ajouté aux bactéries compétentes *DH5* α . Le mélange est laissé 5 min sur glace puis transféré pendant 1 min au bain-marie à 42°C. Après le choc thermique, les bactéries sont incubées 1 h à 37°C dans 500 μ l de milieu LB, étalées sur milieu sélectif et incubées une nuit à 37°C.

b/ Transformation par électroporation

Préparation des bactéries

Les bactéries sont cultivées dans 10 mL de LB sur une nuit. Un mL de cette préculture permet d'inoculer 1 L de LB frais. La culture se fait à 37 °C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une D.O. $_{600nm}$ de 0,5 à 0,8. Les bactéries sont placées 30 min sur la glace puis centrifugées 15 min à froid à 4000 g. Le culot est lavé deux fois dans 500 mL d'eau stérile froide et centrifugé à nouveau 15 min. Les bactéries sont remises en suspension dans 20 mL de glycérol 10 %, centrifugées 10 min et finalement reprises dans 3 mL de glycérol 10 % avant d'être aliquotées, plongées dans l'azote liquide et conservées à - 80 °C.

Electroporation : Le mélange de ligation $(2 \ \mu l)$ est ajouté aux bactéries compétentes. Le mélange est laissé quelques minutes sur glace puis transféré dans une cuve d'électroporation. Le contrôleur d'impulsion est réglé sur 25 μ F de capacité et 2,5 kV/cm, et la résistance à 200 Ω pour *E. coli* ou 400 Ω pour *A. tumefaciens*. Après le choc électrique, les bactéries transformées sont incubées 1 h à 37°C dans 500 μ L de milieu LB, étalées sur milieu sélectif et incubées une nuit à 37°C pour *E. coli* ou 28°C pour *A. tumefaciens*.

2/ Transformation stable d'Arabidopsis

Un clone isolé d'*Agrobacterium tumefaciens*, contenant la construction désirée est mis en culture dans du milieu LB à 28°C pendant une nuit. Les bactéries sont centrifugées à 2500g pendant 15 min puis reprises dans la solution d'infiltration (1/2 MS221, saccharose 5%, silvet L-77 0.05%, acétosyringone 200 µM). Des plantes adultes possédant plusieurs hampes florales avec des boutons floraux présentant l'ensemble des stades de développement de la fleur, sont transformées par "floral dip" (Clough and Bent, 1998). Les hampes florales sont plongées dans la suspension bactérienne pendant 1 min. Après égouttage, les plantes sont placées en maxi serre à l'obscurité pendant 48 h, puis un taux d'humidité normal est rétabli progressivement.

V - Matériel végétal et conditions de culture

L'ensemble des expériences a été réalisé sur des plantes d'*Arabidopsis thaliana* d'écotype Columbia-0 (Col-0). Les mutants d'insertion T-DNA ont été obtenus des collections de l'institut SALK (noté SALK, http://www.salk.edu/), GABI-KAT (noté GK, http://www.gabi-kat.de/), et SAIL (noté SAIL, http://www.salk.edu/). Avant germination, les graines ont été stérilisées en surface puis placées sur un milieu Murashige and Skoog (Duchefa) solidifié avec 0,8 % d'agar. Après deux jours de vernalisation à 4°C à l'obscurité, pour permettre une germination homogène, les semis ont été placés à 21°C sous une intensité lumineuse de 70 μ mol m⁻²s⁻¹ avec une photopériode de 12 h. Après 12 jours, les plantes repiquées en terre ont été transférées en chambre de culture où les conditions sont contrôlées: intensité lumineuse de 70 μ mol m⁻²s⁻¹, photopériode de 16 h, 28°C. Quatre semaines après la germination, les plantes sont transférées en serre sous une photopériode de 16 h pour induire la floraison. Les mutants T-DNA utilisés sont les suivants :

Gène touché	Lignée
At5g57840	SALK_020511
At2g19070	SALK_055511
At1g69500	SAIL_1149_B03
At4g35420	SAIL_837_D01
At4g20420	SALK_031864
At1g01280	SALK_119582
At4g34850	GK-089C04.01
At1g02050	SALK_134643C
At3g59530	SALK_033871
At3g11980	NASC ID: N1632
At1g68540	SALK_129453C
At3g42960	SAIL_423_H04
At4g00040	GT_5_83040
At4g00040	SAIL_829_D04
At1g62940	SM_3.37225
At1g03390	GK-223H01
At4g29250	SAIL_424_H09
At4g29250	SALK_147254
At4g23840	SALK_126074
At4g23840	SAIL_3_F11
At5g41040	SALK_048898
At5g63560	SALK_034447
At2g23510	SALK_036607
At4g13840	SALK_087857
	Gène touché At5g57840 At2g19070 At1g69500 At4g35420 At4g20420 At1g01280 At4g34850 At1g02050 At3g59530 At3g42960 At4g00040 At1g62940 At1g03390 At4g23840 At4g23840 At5g41040 At5g4310 At3g3560

VI – Analyse et caractérisation de lignées d'insertion T-DNA

La caractérisation des mutants T-DNA consiste à rechercher des plantes possédant un insert T-DNA et à confirmer son site d'insertion dans le gène d'intérêt. Pour cela, les graines fournies par les banques de mutant, sont mises à germer *in vitro* sur milieu contenant l'antibiotique correspondant au marqueur de sélection porté par le T-DNA. Les plantules résistantes sont ensuite génotypées pour confirmer la site d'insertion du T-DNA et identifier des individus homozygotes pour l'insertion. Pour cela, l'ADN génomique (ADNg) de ces plantes est extrait et le site d'insertion du T-DNA est analysé par PCR.

1/ Extraction d'ADN génomique « quick and dirty »

Cette méthode permet d'extraire rapidement de l'ADNg d'un grand nombre d'échantillons, à partir de peu de matériel biologique. La qualité de l'ADNg obtenue est suffisante pour réaliser les PCR.

Une jeune feuille d'*Arabidopsis* (de environ 5 mg) est broyée dans 400 µl de tampon d'extraction (Tris-HCl pH 7.5 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5%). Après centrifugation (12000g, 5 min), 300 µl du surnageant sont prélevés et l'ADN précipité par 300 µl d'isopropanol pendant 5 min à température ambiante. Après centrifugation (12000g, 10 min), le culot d'ADN est repris dans 100 µl de Tris-HCl pH 8.5 (10 mM). 0,8 µl de cet ADN est utilisé comme matrice pour le génotypage par PCR.

2/ Génotypage par PCR

Le génotypage des populations de mutants nécessite une analyse par PCR. Pour chaque lignée, 2 combinaisons d'amorce différentes sont utilisées :

- Une amorce sens et une amorce antisens s'hybridant spécifiquement sur le gène d'intérêt, de part et d'autre de la zone prédite de l'insertion du T-DNA. La présence d'un amplicon met en évidence au moins un allèle sans insertion T-DNA.

- Une amorce sens s'hybridant spécifiquement avec le gène d'intérêt et une amorce antisens s'hybridant spécifiquement sur le T-DNA. Cette combinaison doit permettre d'amplifier un fragment hybride gène d'intérêt/T-DNA, c'est-à-dire l'allèle du gène interrompu par le T-DNA. Par la suite, le séquençage de ce produit PCR permet de localiser précisément la zone d'insertion du T-DNA dans le gène.

Amorces utilisées :

Amorce sens

 At1g69500
 5'-TCTGAGGCATTGCTTGGTAA-3'

 At4g35420
 5'-GATGCCAAGGAGTGTTCCAT-3'

 At4g20420
 5'-AGCATGTTCTGGTTCATCTTCA-3'

 At1g01280
 5'-TTTACCTCATCGGGACTTGG-3'

 At4g34850
 5'-GGCGCAGAAACAGAGAAGAC-3'

 At1g02050
 5'-GCATCCACCATCTTTCTTCC-3'

 At1g02050
 5'-GGCGCAGAAACAGAGAGAGACG-3'

 At1g68540
 5'-GGCCCAAGTCTAAGCCACA-3'

 At3g42960
 5'-TGGCGAACTCAGACAAAAGA-3'

 At4g00040
 5'-GTTCCCCAACCATCATCAAACAG-3'

 At1g03390
 5'-AATGGCTTCTTGCATCCAAGA-3'

Amorce antisens

5'-CATATGTGACCATCCCTCCA-3' 5'-TGGACCCAAAAACGAGTCAT-3' 5'-AGAGGAAAGATTCCACAGTCAT-3' 5'-CTTCCCGTTCTCACCAGGTA-3' 5'-AACCCGTTATGAGAAGATCCAA-3' 5'-GGGGTTGTTCTCAGCAATGT-3' 5'-CTTGTGCCGGTGTTCTGC-3' 5'-TGAAGGATCCAAATCCCAAC-3' 5'-TGGTTAGCATCGGTTCCTG-3' 5'-TTATTTATGATCATTTAAAGAT-3' Amorce T-DNA

5'GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC-3' 5'-GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC3' 5'-ATTTTGCCGATTTCGGAAC-3' 5'-ATATTGACCATCATACTCATTGC-3' 5'-ATTTTGCCGATTTCGGAAC-3' 5'-ATTTTGCCGATTTCGGAAC-3' 5'-GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC-3' 5'-ATTTTGCCGATTTCGGAAC-3' 5'-ATTTTGCCGATTTCGGAAC-3'
At2g19070	5'-ACTGGCGATGTGGGCTTTTGA-3'	5'-TGATGATGATGATGATGATATCT-3'	5'-ATTTTGCCGATTTCGGAAC-3'
At4g29250	5'- CTTAGCCGATCCAGTTTGTGC-3'	5'-AGAGCCAAATCCTCCTCGAAC-3'	5'-GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC-3
At3g23840	5'-TTCAAACTCAGTTACCTGTAGA-3'	5'-CTACTAATCTACGTTAAGCACG-3'	5'-ATTTTGCCGATTTCGGAAC-3'
At5g41040	5'-TCATTACTATCCTCTCGCTGG-3'	5'-GCTTCTCTGACTAATCCCACC-3'	5'-ATTTTGCCGATTTCGGAAC-3'
At5g63560	5'-TTTTTGGGCAGTACATTCGAG-3' 5'-GAGGAATTCAATGGGTCGATCTCA	5'-AGGAAGTCCAAGCAGCACAT-3' 5'-CTAGAGCTCTCATGGCGCGATCA	5'-ATTTTGCCGATTTCGGAAC-3'
At4g13840	AGAACAG-3'	AACCA-3'	5'-ATTTTGCCGATTTCGGAAC-3'
At2g23510	5'-TGCCGATTCACATAGGTTCA-3'	5'-AAATCAGGCCGCAATGTAAC-3'	5'-ATTTTGCCGATTTCGGAAC-3'

VII – Extraction et analyses métaboliques

1/ Extraction de phénols solubles

Les tissus végétaux sont prélevés, pesés et rapidement congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Pour l'extraction des métabolites solubles, les tissus sont broyés finement dans un tube eppendorf avec des billes de verre avec un broyeur *Vivadent* quand les tissus sont encore congelés (12 s). Un mélange méthanol/eau (4/1 ; v/v) est alors ajouté sur le broyat (700 μ l / 100mg de poids frais de bourgeons floraux ; 120 μ l / 1mg de graines), qui est broyé une seconde fois. L'ensemble est centrifugé 10 min à 13000 g et à 4°C. Le surnageant est prélevé puis conservé à -20°C jusqu'à son analyse.

2/ Analyse chromatographique des métabolites.

Le matériel et les conditions d'analyse en HPLC et LC/MS/MS des métabolites sont décrits dans la publication Grienenberger et *al*. (2009).

VIII - Analyses du pollen

1/ Préparation de pollen

Une vingtaine d'inflorescences d'*Arabidopsis* avec un maximum de fleurs ouvertes sont récoltées dans un tube falcon de 50 ml. 40 ml de PBS 1X ou de mannitol 0,3 M y sont ajoutés, puis le tube est vortexé vigoureusement pour récupérer les grains de pollen des fleurs. L'ensemble est ensuite filtré avec une toile à bluter de 50 µm. Le filtrat est récupéré dans un nouveau falcon, puis centrifugé à 1500 g pendant 5 min. Le surnageant est enlevé délicatement avec une pipette pour ne pas ressuspendre le culot constitué des grains de pollen. Environ 1 ml de surnageant est laissé au fond du tube, avec lequel le culot est repris. L'ensemble est transféré dans un tube eppendorf, une nouvelle centrifugation à 1500 g permet de culoter les grains de pollen. Le pollen ainsi concentré peut servir pour des analyses ultérieures.

2/ Coloration à l'Auramine-O

Le pollen récolté selon la méthode décrite est incubé 5 min. dans une solution d'Auramine O à 0,01% dans l'eau. L'ensemble est centrifugé 1 min. à 1000g puis le surnageant et éliminé. Le culot de pollen est lavé deux fois en répétant l'opération puis est repris dans environ 50 μ l. 10 μ l sont déposés sur lame et recouverts d'une lamelle, puis observés au microscope à épifluorescence en utilisant le filtre FITR (λ max émission = 460-500 nm).

3/ Microscopie électronique à transmission

Les grains de pollen sont fixés dans une solution de glutaraldéhyde 3% dans un tampon phosphate 150 mM pH7,4, pendant 2 heures à température ambiante, puis la nuit à 4°C. Le pollen est concentré par une centrifugation de 10 secondes à 1000g et un maximum de tampon est prélevé. 100 μ l de gélose « low melting » en surfusion est ajouté sur le culot puis homogénéisée. Après polymérisation, la gélose est découpée en cubes de 3 mm³ et mise dans un nouveau tube. Les cubes sont lavés deux fois dans de l'eau bidistillée 15 min. à température ambiante puis post-fixés dans une solution à 1% de tétraoxyde d'osmium (OsO₄) 2 heures à 4°C. Les cubes sont lavés 3 fois 15 min dans de l'eau bidistillée puis post-fixés dans une solution d'acétate d'uranyl 2% la nuit à 4°C. Après trois lavages de 15 min dans l'eau, les échantillons sont déshydratés par des bains successifs d'éthanol à 50%, 70% et 90% de 20 min chacun puis trois bains de lh dans de l'éthanol 100% à température ambiante. L'inclusion des échantillons commence par un bain des cubes de 20 min dans de l'oxyde de propylène, puis dans un mélange oxyde de propylène/EPON (v/v) et finalement 2 heures dans de l'EPON 100%. La polymérisation de l'EPON est effectuée à 60°C pendant 72 heures. Des coupes ultrafines sont réalisées avec un microtome à diamant (Reichert Ultracut E) et observées avec un microscope électronique à transmission (Hitachi H7600).

4/ Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage à été réalisée avec un appareil Philips XL30 ESEM (FEI, Eindhoven, Pays-Bas), équipé avec un détecteur d'électron secondaire Everhart-Thornley et un filament LaB6, et combiné avec un système de microanalyse PGT 'Spirit' EDX (Princeton Gamma-Tech, Princeton, NJ, USA). Les grains de pollen ont été déposés directement sur un adhésif en carbone en tapotant une fleur ouverte, puis métallisés à l'or (Sputter Coater S150A; Edwards High Vacuum, Crawley, Royaume-Uni) 3 min à 50mV. Les observations ont été réalisées en mode « vide poussée » (5,4 Torr) à 20 kV.

5/ Germination in vitro du pollen

Les tests de germination *in vitro* du pollen ont été faits selon le protocole décrit dans (Boavida and McCormick, 2007). Le milieu de germination est composé de 0,01% d'acide borique, 5mM de

CaCl₂, 5mM de KCl, 1mM de MgSO₄, 10% de saccharose et 1,5% d'agarose *low melting*. Le pH est ajusté à 7,5. Le milieu est coulé sur des lames de microscope, puis le pollen est déposé en secouant des fleurs ouvertes au-dessus des lames. Celles-ci sont placées dans une boîte fermée avec un papier humide, puis placées à l'obscurité, à une température de 22°C. La germination du pollen est observée au microscope, après 2 à 16h de germination.

6/ Germination in vivo du pollen, coloration du pistil à l'Aniline

Les sépales, pétales et étamines sont enlevés de fleurs dont les pétales commencent à apparaître. Les pistils sont laissés 24h en serre pour qu'ils s'allongent, puis sont pollinisés manuellement en secouant une fleur au-dessus. Entre 0 et 24 heures post-pollinisation, les pistils sont prélevés puis coupés longitudinalement en deux parties identiques. Celles-ci sont fixées dans une solution éthanol / acide acétique (3 / 1; v / v) pendant une heure à température ambiante, puis incubées dans une solution NaOH 8M pendant la nuit. Les pistils sont lavés plusieurs fois dans de l'eau distillée puis incubés dans un solution d'aniline 0,1% dissout dans 0,1M K₂HPO₄, pendant 3 heures, dans le noir complet. Le pistil coloré est monté entre lame et lamelle dans une goutte de glycérol, puis observé sous lumière UV (λ max émission = 330 nm) avec un microscope à épifluorescence.

7/ Coloration d'Alexander

Plusieurs étamines sont prélevées avec une pince, et déposées sur une lame de microscope puis immergées dans une goutte de la solution d'Alexander (Alexander, 1969) et couvertes d'une lamelle. Après 5 min, la lame est observée au microscope.

IX - Histologie

1/ Coloration GUS

Les conditions d'incubation des tissus pour la coloration β -glucuronidase (GUS) ainsi que l'inclusion des tissus, la réalisation et l'analyse des coupes sont décrites dans la publication (Grienenberger et al., 2009).

2/ Immunocytochimie

Des bougeons floraux d'*Arabidopsis* sont prélevés puis fixés dans une solution aqueuse FAA (Formaldéhyde 3,7%; Ethanol 50%; Acide acétique 5%). Les échantillons sont ensuite déshydratés dans une série de bains d'éthanol, puis inclu dans du paraplast avant d'effectuer des coupes de 10 µm d'épaisseur avec un microtome Leica RM2155. Les coupes sont déposées sur lame, séchées puis

déparafinées dans de l'histoclear avant de réhydrater les échantillons dans une solution de PBS, puis bloquées pendant une heure dans une solution PBS contenant de la BSA 1%, du Triton 0,05% et du sérum de chèvre 5%. L'anticorps primaire de lapin est dilué au 1/200^{ème} dans le tampon de blocage et laissé au contacte des coupes la nuit à 4°C. Les lames sont lavées 3 fois dans du PBS, 1% BSA, 0,05% Triton, puis l'anticorps secondaire (chèvre anti lapin couplé à la phosphatase alcaline), dilué au 1000^{ème} dans du PBS est ajouté sur les lames. Après une incubation de 1 heure à température ambiante, les lames sont lavées 4 fois dans du PBS, le pH ajusté à 8,1 dans un tampon Tris/HCl 100mM et les signaux sont révélés avec le réactif FastRed (Roche). Les lames sont montées dans du PBS/Glycérol (1/1 ; v/v) puis observées au microscope.

X – Production de protéines recombinantes en système bactérien.

1/ Obtention de la séquence codante et clonage dans le vecteur d'expression

Une transcription reverse a été effectuée à partir d'ARN totaux, extraits de jeunes bourgeons de plants d'*Arabidopsis thaliana* d'écotype Col-0 agés de 2 mois, d'oligo(dT) et de la SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. L'ADNc double brin a été obtenu par amplification PCR, en se servant de la Taq polymérase haute-fidélité Phusion Master Mix (Finnzymes) et en utilisant 1 μ l du produit de rétrotranscription comme matrice. Des amorces sens et antisens s'hybridant sur le gène d'intérêt permettent d'ajouter un site de restriction en amont de l'ATG initiateur et en aval du codon stop. Les amorces utilisées pour les différents clonages sont les suivantes :

At1g62940 EcoRI ATG / stop SacI At1g69500 XbaI ATG / stop HindIII At4g35420 EcoRI ATG / Stop SacI At4g34850 EcoRI ATG / stop HindIII At1g02050 NcoI ATG / stop SacI At3g59530 XbaI ATG / stop NcoI At3g11980 EcorI ATG / stop NcoI At1g68540 XbaI ATG / stop NcoI At1g67990 NcoI ATG / stop HindIII At2g19070 NcoI ATG / stop XhoI At1g03390 XbaI ATG / stop NcoI At2g23510 EcoRI ATG / stop XhoI

Amorce sens

5'-GAGGAATTCCAATGGAGAGTCAAAAAGCAAGAAG-3' 5'-GAGTCTAGACATGTCGTTGTGTTTGGTTAT-3' 5'-GAGGAATTCCAATGGATCAAGCAAAGGGAAA-3' 5'-GAGGCATGGAATGCGAAGCATCGATGCTGC-3' 5'-GAGTCTAGAGATGGAGAAGAAAGGCCAGCA-3' 5'-GAGTCTAGAGATGGCGAGAAGAAAGGCCAGCA-3' 5'-GAGTCTAGAAATGGCGAACTCAGACAAAAG-3' 5'-GAGTCTAGAAATGGCTGCATTACCTGA-3' 5'-GAGCCAATGGCTCCCATAACTTTTAG-3' 5'-GAGTCTAGAAATGGCTCCTTGCATCCAAGA-3' 5'-GAGTCTAGAAATGGCTCCTTGCATCCAAGA-3' 5'-GAGTCTAGAAATGGCTTCTTGCATCCAAGA-3'

Amorce antisens

5'-CTCGAGCTCCTACTTCTTGTTGATGCTGAG-3' 5'-CTCAAGCTTCTATGAACGTCTGGATACAGTA-3' 5'-CTCGAGCTCTTATGGAAGAACAGTAGATAA-3' 5'-CTCAAGCTTTCAGACATCAAGGTTTCGAG-3' 5'-CTCCCATGGTCATTGATTCATTGTCAAAG-3' 5'-CTCCCATGGTTAAGCTCTTCCTTTCAAGA-3' 5'-CTCCCATGGTTAGAGCAGACCCTTCTTCTG-3' 5'-CTCCCATGGCTAGTTGATAAAATCTCA-3' 5'-CTCAAGCTTTCATATAAGACGTCTACATA 3' 5'-CTCCCATGGTTATTATAAAGAT-3' 5'-CTCCCATGGTTATTTATGATCATTTAAAGAT-3' 5'-CTCCCATGGTTATTTATGATCATTTAAAGAT-3'

Les produits de PCR sont purifiés par extraction phénol/chloroforme, repris dans de l'eau, dosés puis digérés et ligués directement dans le plasmide pGEX-KG préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction. Chaque vecteur recombinant a ensuite été séquencé selon la méthode de Sanger, puis utilisé pour transformer *E. coli BL21-G612*.

2/ Production hétérologue de la protéine par E. coli.

Une aliquote du glycérol stock du clone dans E. coli BL21-G612 est étalé sur boîte LB contenant de l'ampicilline (50 µg.ml⁻¹) et de la kanamycine (50 µg.ml⁻¹), puis laissée à 37°C jusqu'à apparition des colonies. Une colonie sert à ensemencer une préculture de 10 ml de LB contenant de l'ampiciline et de la kanamycine, qui est mise en culture la nuit. Cette préculture sert à ensemencer au 1/100^{ème} une culture de 250 ml dans un erlenmeyer de 2 litres. La culture est mise à pousser à 37°C pendant 3h30 - 4h00 (DO_{600nm} < 0,7), puis la culture est refroidie dans un bac d'eau jusqu'à environ 20°C. La production de la protéine est alors induite par l'ajout d'IPTG (0,3 mM final), et la culture est laissée sous agitation à température ambiante pendant 3h30. La culture est centrifugée à 3000g pendant 15 min à température ambiante puis le culot est repris dans 20ml d'un tampon de lyse (PBS 1X avec une pastille de Protease Inhibitor Coktail, Roche). Les bactéries sont lysées en utilisant la French press (2 passages à 700 psi), et le lysat est centrifugée à 10000g et 4°C pendant 15 min. Le surnageant est prélevé puis dilué de sorte à avoir un volume final de 40 ml. Le surnageant est chargé sur une colonne glutathion-agarose (GSTrap 4B 1ml, GE healthcare) à 0,8ml.min⁻¹. Après le passage du surnageant, la colonne est lavée en passant 10 volumes de la colonne de PBS, puis la protéine est éluée avec un tampon d'élution (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, 15 mM glutathion réduit) à 0,5 ml.min⁻¹. Des fractions de 0,5 ml sont récupérées et analysées séparément par PAGE et coloration au bleu de Coomassie. Les meilleures fractions sont rassemblées, puis digérées à la thrombine (10 U/mg protéine) pendant 4h dans la glace.

X – Activités enzymatiques

1/ Conditions d'incubation

Les conditions des activités enzymatiques de SHT et de TSM1/CCoAOMT-like sont décrites dans la publication (Grienenberger et al., 2009).

Les activités ACOS5 ont été mesurées dans les conditions suivantes : dans un volume final de 100 μ l, 60mM tampon phosphate pH 7,5, MgCl₂ 10mM, ATP 5mM, DTT 2,5mM, CoA-SH 1mM, acide gras (dissout dans 0,1% Triton X-100) 0,2 mM, ACOS5 recombinante 5 μ g. L'ensemble est assemblé dans la glace est mis à incuber à 30°C pendant 30 min, 1h ou 2h, puis stoppé par l'ajout de 10 μ l de HCl 1N.

Les incubations PKS ont été réalisées dans les conditions suivantes: dans un volume final de 100 μ l. 100mM tampon phosphate pH 7,0, Malonyl-CoA 0,1 mM (contenant ou non 25 nCi de [2-¹⁴C]

malonyl-CoA), ester de CoA d'acide gras 0,1 mM et 5 μ g d'enzyme recombinante. L'ensemble est assemblé dans la glace puis mis a incubé à 30°C pendant 1h.

Les co-incubations ACOS5/PKS sont réalisées dans les conditions de Acos5, 30 min après le début de l'incubation avec Acos5, la PKS (5 µg) et du malonyl-CoA (0,1 mM final) sont ajoutés dans le milieu d'incubation puis incubés 1h30 à 30°C.

La demarche expérimentale pour détecter les activités TPR sont équivalentes à celle des PKS, que se soit en co-incubant avec ACOS5 ou en donnant un ester CoA d'acide gras pour substrat, 10 µg de TPR recombinante et 1mM de NADPH sont ajouté en même temps que les PKS dans le milieu d'incubation, puis incubés 1h30 à 30°C.

Dans tous les cas, en fin de réaction, les polykétides sont extraits avec 500 µl d'acétate d'éthyle, évaporés sous azote puis repris dans 100 µl de méthanol.

2/ Analyse des produits de réaction

L'analyse des produits froids est réalisée en UPLC-MS/MS par recherche des masses des produits selon les conditions décrites dans (Grienenberger et al., 2009). Les conditions chromatographiques sont identiques, excepté le gradient qui est le suivant : gradient eau/acétonitrile linéaire de 50 à 100% d'acétonitrile en 25 min, 100% acétonitrile pendant 2 min, 100 à 50% d'acétonitrile en 1 min puis 50% acétonitrile pendant 4 min.

L'analyse des produits radiomarqués est faite sur plaque de silice (Merck, Silica gel 60 F_{254}) dans une mélange acétate d'éthyle / hexane / acide acétique (63 / 27 / 5 ; v / v / v), puis révélé au phosphorimager (TyphoonTM FLA 7000 biomolecular imager).

XII – Analyse des protéines

1/ Extraction de protéines à partir de matériel végétal

Les tissus sont prélevés et congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les échantillons congelés sont réduits en poudre par un broyeur à billes. La poudre est reprise dans du tampon d'extraction (NaH₂PO₄ pH 7,5, 100 mM, DTT 10 mM) (1ml/100mg de poids frais) et broyée à nouveau. Le broyat obtenu est centrifugé à 13000 g, pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est prélevé et la concentration en protéines solubles totales est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

2/ Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les gels de séparation (0,75 mm x 7 cm x 9 cm) étaient composés de 12,5% de polyacrylamide (acrylate/bisacrylamide, 29:1). Avant dépôt, les échantillons protéiques sont mélangés avec 20% (v/v)

d'un tampon de charge (Tris-HCl 60 mM pH 6,8, ß-mercaptoéthanol 5%, glycérol 10%, bleu de bromophénol 0,01% et SDS 1%) et chauffés à 100°C pendant 2 min pour une dénaturation complète des protéines. Le tampon d'électrophorèse est composé de glycine (150 mM), Tris-HCl pH 8,3 (20 mM), SDS 0,1%. La migration verticale est réalisée dans une cuve d'électrophorèse BioRad (Mini Protean 3) à une intensité de 20 mA par gel pour une tension de 100 à 120 V.

3/ Révélation des protéines au bleu de Coomassie

Le gel d'électrophorèse est incubé 15 min dans la solution de coloration (bleu de Coomassie R250 0,25%, méthanol 50%, acide acétique 7%). Une fois les bandes protéiques révélées, la décoloration du gel s'effectue dans un mélange acide acétique 7,5% méthanol 30%.

4/ Transfert et immunodétection des protéines (western blot)

Après séparation par SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur membrane Immobilon P (0,45 μ m, Millipore) pendant 1 h à 122 mA et 30 V dans le tampon de transfert de composition suivante : Tris-HCl pH 8,3 20 mM, glycine 150 mM. Après le transfert, la membrane est incubée pendant 1 h à 37°C dans un tampon Lait (PBS 1x, lait en poudre 5%, tween 0,1 %), puis mise en contact avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt, dilué au 1/10000éme, pendant 2 h à température ambiante.

La membrane est ensuite lavée 3 fois avec du tampon Lait, puis elle est mise en présence de l'anticorps secondaire GAR (Goat Anti-Rabbit) couplé à la phosphatase alcaline (dilué au 1/10000éme), pendant 1 h à température ambiante. Cet anticorps secondaire permet la visualisation du complexe anticorps primaire/antigène. Après lavages dans du tampon PBS, Tween 0,2%, la membrane est mise en contact avec le substrat de la phosphatase alcaline (Immun-Star : chemiluminescent protein detection systems – BioRad) et révélée sur film radiographique.

XIII - Protocole d'immunisation des lapins

Les lapins utilisés sont des femelles de souche Néo-Zélandaise de 2 à 2,5 kg (âgées de deux mois). Un premier prélèvement de sang sert de sérum pré-immun (témoin négatif). Puis, une émulsion d'antigène (200µg) et d'adjuvant de Freund complet est injectée par voie intradermique. Un mois plus tard, le sang du lapin est prélevé à raison de 30 mL chaque semaine pendant un mois. Ensuite, une émulsion des deux tiers de la quantité initiale d'antigène et d'adjuvant de Freund incomplet est injecté au lapin par voie sous-cutanée. Environ douze jours plus tard, le lapin est anesthésié puis sacrifié. Un volume de 130 à 150 mL de sang est prélevé par voie intracardiaque, soit 70 à 80 mL de sérum.

XIV - Stress biotiques ou abiotiques des plantes

1/ Infection d'Arabidopsis par Botrytis cinerea

Botrytis cinerea (souche IMI169558) est cultivé sur milieu *Potato Dextrose Agar* (Duchefa) à 22°C. Des spores sont récoltées, filtrées sur Miracloth (Calbiochem), lavées à l'eau stérile et conservées à une densité de 4.10^6 spores/ml, à 4°C. Les plantes sont placées dans des maxi-serres, dans une atmosphère saturée en humidité. Une micro blessure est réalisée sur les feuilles à inoculer de chaque coté de la nervure centrale, à l'aide d'une aiguille. L'inoculation est réalisée en disposant 5 µl d'une suspension de spores à 2.10^5 spores/ml dans du *Potato Dextrose Broth* (Duchefa) sur les blessures.

2/ Infection d'Arabidopsis par Pseudomonas syringae

L'écotype Col-0 d'*Arabidopsis* est inoculé par *Pseudomonas syringae* pv tomato (*Pst*) : souche virulente DC3000 et souches exprimant les gènes d'avirulence *avrRpt2* ou *avrRpm1*, reconnus par les gènes de résistance correspondants de la plante.

Les bactéries sont cultivées dans du NYGB (Bactopeptone 5 g/l, yeast extract 3 g/l, glycérol 20 g/l) contenant de la rifampicine (100 µg/ml) et de la kanamycine (25 µg/ml) à 28°C. Lorsqu'elles atteignent la phase exponentielle de croissance (DO₆₀₀= 0,6 à 1), les bactéries sont centrifugées (2500g, 10 min), puis suspendues dans du MgCl₂ (10 mM). Les bactéries sont diluées à une concentration de 10⁷ cfu/ml (DO₆₀₀= 0,02) afin d'avoir des réponses de défense fortes. La suspension bactérienne est ensuite infiltrée dans les espaces intracellulaires sur toute la surface des feuilles, à l'aide d'une seringue sans aiguille. Pour faciliter l'infiltration, les plantes sont placées, la veille de l'infection, en conditions d'humidité élevée afin d'ouvrir les stomates.

3/ Traitement du pollen aux UV-B

Le pollen, déposé sur le milieu de germination *in vitro* d'une lame de microscope est placé sous une lampe UV-B émettant une lumière à 312 nm (VL-6.M, 6W, 6,8 J/m2/sec, Fisher Bioblock Scientific). Les lames sont laissées entre 0 et 4h à 15 cm de la lampe, puis le pollen est mis à germer à 22°C pendant 16h.

XV – Analyses phylogénétiques

Les arbres phylogénétiques ont été réalisés avec les séquences protéiques. L'alignement multiple a été fait en se servant du logiciel MUSCLE, puis corrigé par le logiciel Gblocks. L'arbre à été construit en se servant de la méthode « Maximum likelihood » avec le logiciel PhyML, puis la fiabilité de l'arbre testé par Bootstrap (999 replicats). L'arbre a été mis en forme avec le logiciel FigTree v.1.2.3.

Bibliographie

Bibliographie

Aarts, M.G. et al. (1997). The Arabidopsis MALE STERILITY 2 protein shares similarity with reductases in elongation/condensation complexes. Plant J 12: 615–623.

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**: 3098–3109.

Ageez, A., Kazama, Y., Sugiyama, R., and Kawano, S. (2005). Male-fertility genes expressed in male flower buds of Silene latifolia include homologs of anther-specific genes. Genes Genet Syst **80**: 403–413.

Ahlers, F., Lambert, J., and Wiermann, R. (2003). Acetylation and silylation of piperidine solubilized sporopollenin from pollen of Typha angustifolia L. Z Naturforsch C **58**: 807–811.

Ahlers, F., Thom, I., Lambert, J., Kuckuk, R., and Wiermann, R. (1999). H NMR analysis of sporopollrnin from Typha Angustifolia. Phytochemistry **50**: 1095–1098.

Alexander, M.P. (1969). Differential staining of aborted and nonaborted pollen. Stain Technol 44: 117–122.

Allwood, E.G., Davies, D.R., Gerrish, C., Ellis, B.E., and Bolwell, G.P. (1999). Phosphorylation of phenylalanine ammonia-lyase: evidence for a novel protein kinase and identification of the phosphorylated residue. FEBS Lett **457**: 47–52.

Ariizumi, T. et al. (2003). A novel male-sterile mutant of Arabidopsis thaliana, faceless pollen-1, produces pollen with a smooth surface and an acetolysis-sensitive exine. Plant Mol Biol **53**: 107–116.

Atanassov, I., Russinova, E., Antonov, L., and Atanassov, A. (1998). Expression of an anther-specific chalcone synthase-like gene is correlated with uninucleate microspore development in Nicotiana sylvestris. Plant Mol Biol **38**: 1169–1178.

Austin, M.B., and Noel, J.P. (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. Nat Prod Rep **20**: 79–110.

Back, K. et al. (2001). Cloning and characterization of a hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-

(hydroxycinnamoyl)transferase induced in response to UV-C and wounding from Capsicum annuum. Plant Cell Physiol **42**: 475–481.

Baldridge, G.D., O'Neill, N.R., and Samac, D.A. (1998). Alfalfa (Medicago sativa L.) resistance to the rootlesion nematode, Pratylenchus penetrans: defense-response gene mRNA and isoflavonoid phytoalexin levels in roots. Plant Mol Biol **38**: 999–1010.

Baucher, M., Monties, B., Montagu, M.V., and Boerjan, W. (1998). Biosynthesis and genetic engineering of lignin. Critical Reviews in Plant Sciences **17**: 125–197.

Baumert, A. et al. (2005). Formation of a complex pattern of sinapate esters in Brassica napus seeds, catalyzed by enzymes of a serine carboxypeptidase-like acyltransferase family? Phytochemistry **66**: 1334–1345.

Bayer, A., Ma, X., and Stockigt, J. (2004). Acetyltransfer in natural product biosynthesis--functional cloning and molecular analysis of vinorine synthase. Bioorg Med Chem **12**: 2787–2795.

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**: 729–738.

Berenbaum, M.R., and Zangerl, A.R. (1996). Phytochemical diversity: adaptation or random variation? Rec. Adv. Phytochem. **30**: 1–24.

Bernards, M.A. (2002). Demystifying suberin. Can. J. Bot. 80: 227-240.

Bernards, M.A., Lopez, M.L., Zajicek, J., and Lewis, N.G. (1995). Hydroxycinnamic acid-derived polymers constitute the polyaromatic domain of suberin. J Biol Chem **270**: 7382–7386.

Bernasconi, P., Patel, B.C., Reagan, J.D., and Subramanian, M.V. (1996). The N-1-Naphthylphthalamic Acid-Binding Protein Is an Integral Membrane Protein. Plant Physiol **111**: 427–432.

Besseau, S. (2007). Caractérisation fonctionnelle d'HCT, une acyltransférase impliquée dans le métabolisme de phénylpropanoïdes.

Besseau, S. et al. (2007). Flavonoid accumulation in Arabidopsis repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. Plant Cell **19**: 148–162.

Betz, C., McCollum, T.G., and Mayer, R.T. (2001). Differential expression of two cinnamate 4-hydroxylase genes in 'Valencia' orange (Citrus sinensis Osbeck). Plant Mol Biol **46**: 741–748.

Bih, F.Y. et al. (1999). The predominant protein on the surface of maize pollen is an endoxylanase synthesized by a tapetum mRNA with a long 5' leader. J Biol Chem **274**: 22884–22894.

Bird, C.R., and A., S.T. (1981). The biosynthesis of coumarylagmatine in barley seedlings. phytochemistry **20**: 2345–2346.

Bird, C.R., and A., S.T. (1983). AGMATINE COUMAROYLTRANSFERASE FROM BARLEY SEEDLINGS. Phytochemistry **22**: 2401–2403.

Blee, K. et al. (2001). Antisense and sense expression of cDNA coding for CYP73A15, a class II cinnamate 4-hydroxylase, leads to a delayed and reduced production of lignin in tobacco. Phytochemistry 57: 1159–1166.
Blount, J.W. et al. (2000). Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. Plant Physiol 122: 107–116.
Boavida, L.C., Becker, J.D., and Feijo, J.A. (2005). The making of gametes in higher plants. Int J Dev Biol 49: 595–614.

Boavida, L.C., and McCormick, S. (2007). Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in Arabidopsis thaliana. Plant J **52**: 570–582.

Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. Annu Rev Plant Biol 54: 519–546.
Bokern, M., Witte, L., Wray, V., Nimtz, M., and Meurer-Grimes, B. (1995). TRISUBSTITUTED
HYDROXYCINNAMIC ACID SPERMIDINES FROM QUERCUS DENTATA POLLEN. Phytochemistry 39: 1371–1375.

Borg, M., Brownfield, L., and Twell, D. (2009). Male gametophyte development: a molecular perspective. J Exp Bot **60**: 1465–1478.

Bottcher, C. et al. (2008). Metabolome analysis of biosynthetic mutants reveals a diversity of metabolic changes and allows identification of a large number of new compounds in Arabidopsis. Plant Physiol **147**: 2107–2120.

Boudet, A.M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. Phytochemistry **68**: 2722–2735.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**: 248–254.

Britt, A.B. (1996). DNA DAMAGE AND REPAIR IN PLANTS. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 75–100.

Buer, C.S., and Muday, G.K. (2004). The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of Arabidopsis roots to gravity and light. Plant Cell **16**: 1191–1205.

Buer, C.S., and Djordjevic, M.A. (2009). Architectural phenotypes in the transparent testa mutants of Arabidopsis thaliana. J Exp Bot **60**: 751–763.

Burbulis, I.E., Iacobucci, M., and Shirley, B.W. (1996). A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in Arabidopsis. Plant Cell **8**: 1013–1025.

Burhenne, K., Kristensen, B.K., and Rasmussen, S.K. (2003). A new class of N-

hydroxycinnamoyltransferases. Purification, cloning, and expression of a barley agmatine coumaroyltransferase (EC 2.3.1.64). J Biol Chem **278**: 13919–13927.

Bylund, A. et al. (2005). Anticancer effects of a plant lignan 7-hydroxymatairesinol on a prostate cancer model in vivo. Exp Biol Med (Maywood) **230**: 217–223.

Casero, R.A.J. et al. (1991). Isolation and characterization of a cDNA clone that codes for human spermidine/spermine N1-acetyltransferase. J Biol Chem **266**: 810–814.

Cassagne, C. et al. (1994). Biosynthesis of very long chain fatty acids in higher plants. Prog Lipid Res **33**: 55–69.

Chappell, J., and Hahlbrock, K. (1984). Transcription of plant defence genes in reponse to UV light or fungal elicitor. Nature **311**: 76–78.

Chaudhury, A.M. (1993). Nuclear Genes Controlling Male Fertility. Plant Cell 5: 1277–1283.

Cheng, S.H., Sheen, J., Gerrish, C., and Bolwell, G.P. (2001). Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active Arabidopsis CDPK expressed in maize protoplasts. FEBS Lett **503**: 185–188.

Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J **16**: 735–743.

Coleman, C.S., Huang, H., and Pegg, A.E. (1996). Structure and critical residues at the active site of spermidine/spermine-N1-acetyltransferase. Biochem J **316**: 697–701.

Comino, C. et al. (2009). The isolation and mapping of a novel hydroxycinnamoyltransferase in the globe artichoke chlorogenic acid pathway. BMC Plant Biol **9**: 30.

Cooper-Driver, G.A. (2001). Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. Phytochemistry **56**: 229–236.

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.

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.** (2007). 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. **Davin, L.B., and Lewis, N.G.** (2005). Lignin primary structures and dirigent sites. Curr Opin Biotechnol **16**: 407–415.

de Azevedo Souza, C. et al. (2009). A novel fatty Acyl-CoA Synthetase is required for pollen development and sporopollenin biosynthesis in Arabidopsis. Plant Cell **21**: 507–525.

Delwiche, C.F., Graham, L.E., and Thomson, N. (1989). Lignin-Like Compounds and Sporopollenin Coleochaete, an Algal Model for Land Plant Ancestry. Science **245**: 399–401.

Dexter, R. et al. (2007). Characterization of a petunia acetyltransferase involved in the biosynthesis of the floral volatile isoeugenol. Plant J **49**: 265–275.

Dickinson (2000). Pollen coatings : chimaeric genetics and new functions. Sexual plant reproduction **12**: 302–309.

Dixon, R.A., and Paiva, N.L. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. Plant Cell **7**: 1085–1097. **Dobritsa, et al.** (2009a). LAP3, a novel plant protein required for pollen development, is essential for proper exine formation. sexual Plant Reproduction **22**: 167–177.

Dobritsa, A.A. et al. (2009b). CYP704B1 is a Long-chain Fatty Acid {omega}-Hydroxylase Essential for Sporopollenin Synthesis in Pollen of Arabidopsis thaliana. Plant Physiol

Dominguez, E., Mercado, J.A., Quesada, M.A., and Heredia, A. (1999). Pollen sporopollenin: degradation and structural elucidation. Sex. Plant Reprod. **12**: 171–178.

Doughty, J. et al. (1998). PCP-A1, a defensin-like Brassica pollen coat protein that binds the S locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression. Plant Cell **10**: 1333–1347.

Doughty, J., Hedderson, F., McCubbin, A., and Dickinson, H. (1993). Interaction between a coating-borne peptide of the Brassica pollen grain and stigmatic S (self-incompatibility)-locus-specific glycoproteins. Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 467–471.

Dudareva, N., D'Auria, J.C., Nam, K.H., Raguso, R.A., and Pichersky, E. (1998). Acetyl-CoA:benzylalcohol acetyltransferase--an enzyme involved in floral scent production in Clarkia breweri. Plant J **14**: 297–304.

Ehlting, J. et al. (1999). Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in Arabidopsis thaliana represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. Plant J **19**: 9–20.

Emiliani, G., Fondi, M., Fani, R., and Gribaldo, S. (2009). A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. Biol Direct **4**: 7.

Facchini, P.J., Hagel, J., and Zulak, K.G. (2002). Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry. Can. J. Bot. 80: 577–589.

Farmer, M.J., Czernic, P., Michael, A., and Negrel, J. (1999). Identification and characterization of cDNA clones encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase from tobacco. Eur J Biochem **263**: 686–694.

Faulkner, I.J., and Rubery, P.H. (1992). Flavonoids and flavonoid sulphates as probes of auxin-transport regulation in Cucurbita pepo hypocotyl segments and vesicles. Planta **186**: 618–625.

Fellenberg, C., Bottcher, C., and Vogt, T. (2009). Phenylpropanoid polyamine conjugate biosynthesis in Arabidopsis thaliana flower buds. Phytochemistry **70**: 1392–1400.

Fellenberg, C. et al. (2008). Tapetum-specific location of a cation-dependent O-methyltransferase in Arabidopsis thaliana. Plant J **56**: 132–145.

Fergus, B.J., and Goring, D.A.I. (1970). The location of guaiacyl and syringyl lignins in brich xylem tissue. Holzforschung **24**: 113–117.

Ferrer, J.L., Austin, M.B., Stewart, C.J., and Noel, J.P. (2008). Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. Plant Physiol Biochem **46**: 356–370.

Fiebig, A., Kimport, R., and Preuss, D. (2004). Comparisons of pollen coat genes across Brassicaceae species reveal rapid evolution by repeat expansion and diversification. Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 3286–3291.

Fleurence, J., and Negrel, J. (1987). Partial purification of tyramine feruloyl transferase from TMV inoculated tobacco leaves. Phytochemistry **28**: 733–736.

Flores-Sanchez, I.J., and Verpoorte, R. (2009). Plant polyketide synthases: a fascinating group of enzymes. Plant Physiol Biochem **47**: 167–174.

Franke, R. et al. (2002). The Arabidopsis REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. Plant J **30**: 33–45.

Fujiwara, H. et al. (1998). cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5aromatic acyltransferase from Gentiana triflora. Plant J **16**: 421–431.

Funa, N., Ozawa, H., Hirata, A., and Horinouchi, S. (2006). Phenolic lipid synthesis by type III polyketide synthases is essential for cyst formation in Azotobacter vinelandii. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 6356–6361.
Gang, D.R. et al. (1999). Regiochemical control of monolignol radical coupling: a new paradigm for lignin and

lignan biosynthesis. Chem Biol 6: 143–151.

Gang, D.R. et al. (2001). An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. Plant Physiol **125**: 539–555.

Goldberg, R.B., Beals, T.P., and Sanders, P.M. (1993). Anther development: basic principles and practical applications. Plant Cell **5**: 1217–1229.

Goldberg, R.B., Sanders, P.M., and Beals, T.P. (1995). A novel cell-ablation strategy for studying plant development. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **350**: 5–17.

Gou, J.Y., Yu, X.H., and Liu, C.J. (2009). A hydroxycinnamoyltransferase responsible for synthesizing suberin aromatics in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A

Grienenberger, E. et al. (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.

Gutierrez, M.C., Parry, A., Tena, M., Jorrin, J., and Edwards, R. (1995). Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. Phytochemistry **38**: 1185–1191.

Hain, R. et al. (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. Nature **361**: 153–156.

Hammerschmidt, R. (1999). PHYTOALEXINS: What Have We Learned After 60 Years? Annu Rev Phytopathol **37**: 285–306.

Hanson, D.T., Swanson, S., Graham, L.E., and Sharkey, T.D. (1999). Evolutionary significance of isopreneemission from mosses. Am J Bot **86**: 634.

Harding, S.A., Leshkevich, J., Chiang, V.L., and Tsai, C.J. (2002). Differential substrate inhibition couples kinetically distinct 4-coumarate:coenzyme a ligases with spatially distinct metabolic roles in quaking aspen. Plant Physiol **128**: 428–438.

Hatfield, R., and Vermerris, W. (2001). Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. Plant Physiol **126**: 1351–1357.

Heslop-Harrison, J. (1963). Ultrastructural aspects of differentiation in sporogenous tissue. Symp Soc Exp Biol **17**: 315–340.

Higginson, T., Li, S.F., and Parish, R.W. (2003). AtMYB103 regulates tapetum and trichome development in Arabidopsis thaliana. Plant J **35**: 177–192.

Hihara, Y., Hara, C., and Uchimiya, H. (1996). Isolation and characterization of two cDNA clones for mRNAs that are abundantly expressed in immature anthers of rice (Oryza sativa L.). Plant Mol Biol **30**: 1181–1193.

Hoffmann, L. et al. (2004). Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinate

hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. Plant Cell 16: 1446–1465.

Hoffmann, L. et al. (2001). Identification of the enzymatic active site of tobacco caffeoyl-coenzyme A Omethyltransferase by site-directed mutagenesis. J Biol Chem **276**: 36831–36838.

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.

Holton, T.A., and Cornish, E.C. (1995). Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. Plant Cell 7: 1071–1083.

Hotze, M., Schroder, G., and Schroder, J. (1995). Cinnamate 4-hydroxylase from Catharanthus roseus, and a strategy for the functional expression of plant cytochrome P450 proteins as translational fusions with P450 reductase in Escherichia coli. FEBS Lett **374**: 345–350.

T., H. et al. (2008). Genevestigator V3: A Reference Expression Database for the Meta-Analysis of Transcriptomes. Adv Bioinformatics **2008**:

Hu, G.B., Mei, X.G., Gong, W., and Ke, T. (2002). [Differences in gene expression between Taxus chinensis cells during Taxol-synthesis phase and those during non-Taxol-synthesis phase]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao **18**: 512–515.

Hu, W.J. et al. (1999). Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees. Nat Biotechnol **17**: 808–812.

Hu, W.J. et al. (1998). Compartmentalized expression of two structurally and functionally distinct 4coumarate:CoA ligase genes in aspen (Populus tremuloides). Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 5407–5412.

Huang, M.D., Wei, F.J., Wu, C.C., Hsing, Y.I., and Huang, A.H. (2009). Analyses of advanced rice anther transcriptomes reveal global tapetum secretory functions and potential proteins for lipid exine formation. Plant Physiol **149**: 694–707.

Humphreys, J.M., Hemm, M.R., and Chapple, C. (1999). New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multifunctional cytochrome P450-dependent monooxygenase. Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 10045–10050.

Hurtado-Cabello, F., Durst, F., Jorrin, J.V., and Werck-Reichhart, D. (1997). Coumarins in Helianthus tuberosus/ characterization, induced accumulation and biosynthesis. Phytochemistry **49**: 1029–1036.

Inoue, K. et al. (1998). Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-Omethyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase in relation to lignification. Plant Physiol **117**: 761–770.

Ito, T. et al. (2007). Arabidopsis MALE STERILITY1 encodes a PHD-type transcription factor and regulates pollen and tapetum development. Plant Cell **19**: 3549–3562.

Ito, T., and Shinozaki, K. (2002). The MALE STERILITY1 gene of Arabidopsis, encoding a nuclear protein with a PHD-finger motif, is expressed in tapetal cells and is required for pollen maturation. Plant Cell Physiol **43**: 1285–1292.

Iwashina, T. (2003). Flavonoid function and activity to plants and other organisms. Biol Sci Space **17**: 24–44. **Jacobs, M., and Rubery, P.H.** (1988). Naturally occurring auxin transport regulators. Science **241**: 346–349. **Jaeck, E. et al.** (1992). Regulation of enzymes involved in lignin biosynthesis: induction of O-methyltransferase mRNAs during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. Mol Plant Microbe Interact **5**: 294–300.

Jin, S., and Yoshida, M. (2000). Antifungal compound, feruloylagmatine, induced in winter wheat exposed to a low temperature. Biosci Biotechnol Biochem 64: 1614–1617.

Kajita, S., Hishiyama, S., Tomimura, Y., Katayama, Y., and Omori, S. (1997). Structural Characterization of Modified Lignin in Transgenic Tobacco Plants in Which the Activity of 4-Coumarate:Coenzyme A Ligase Is Depressed. Plant Physiol **114**: 871–879.

Kajita, S., Katayama, Y., and Omori, S. (1996). Alterations in the biosynthesis of lignin in transgenic plants with chimeric genes for 4-coumarate: coenzyme A ligase. Plant Cell Physiol **37**: 957–965.

Kao, Y.Y., Harding, S.A., and Tsai, C.J. (2002). Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. Plant Physiol 130: 796–807.

Kliebenstein, D.J. et al. (2007). Characterization of seed-specific benzoyloxyglucosinolate mutations in Arabidopsis thaliana. Plant J **51**: 1062–1076.

Koeduka, **T. et al.** (2006). Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. Proc Natl Acad Sci U S A **103**: 10128–10133.

Kojima, M., and Uritani, I. (1973). Studies on Chlorogenic Acid Biosynthesis in Sweet Potato Root Tissue in Special Reference to the Isolation of a Chlorogenic Acid Intermediate. Plant Physiol **51**: 768–771.

Kolattukudy, P.E. (1980). Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. Science 208: 990–1000.

Kolattukudy, P.E. (2001). Polyesters in higher plants. Adv Biochem Eng Biotechnol 71: 1–49.

Koltunow, A.M., Truettner, J., Cox, K.H., Wallroth, M., and Goldberg, R.B. (1990). Different Temporal and Spatial Gene Expression Patterns Occur during Anther Development. Plant Cell **2**: 1201–1224.

Koutaniemi, S. et al. (2005). Characterization of basic p-coumaryl and coniferyl alcohol oxidizing peroxidases from a lignin-forming Picea abies suspension culture. Plant Mol Biol **58**: 141–157.

Lacombe, E. et al. (1997). Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. Plant J **11**: 429–441.

Laflamme, P., St-Pierre, B., and De Luca, V. (2001). Molecular and biochemical analysis of a Madagascar periwinkle root-specific minovincinine-19-hydroxy-O-acetyltransferase. Plant Physiol **125**: 189–198.

Landry, L.G., Chapple, C.C., and Last, R.L. (1995). Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. Plant Physiol **109**: 1159–1166.

Langcake, P., and McCarthy, W.V. (1979). The relationship of resveratrol production to infection of grapevine by Botritis cinerea. Vitis 18: 244–253.

Larbat, R. et al. (2007). Molecular cloning and functional characterization of psoralen synthase, the first committed monooxygenase of furanocoumarin biosynthesis. J Biol Chem **282**: 542–554.

Lawton, M.A., and Lamb, C.J. (1987). Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding, and infection. Mol Cell Biol **7**: 335–341.

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**: 1985–1998.

Lewis, N.G. (1999). A 20(th) century roller coaster ride: a short account of lignification. Curr Opin Plant Biol **2**: 153–162.

Li, J., Ou-Lee, T.M., Raba, R., Amundson, R.G., and Last, R.L. (1993). Arabidopsis Flavonoid Mutants Are Hypersensitive to UV-B Irradiation. Plant Cell 5: 171–179.

Lindermayr, C. et al. (2002). Divergent members of a soybean (Glycine max L.) 4-coumarate:coenzyme A ligase gene family. Eur J Biochem **269**: 1304–1315.

Liswidowati, Melchior, F., Hohmann, F., Schwer, B., and Kindl, H. (1991). Induction of stilbene synthase by Botritis cinerea in cultured gravevine cells. Planta **183**: 307–314.

Lois, R., and Buchanan, B.B. (1994). Severe sensitivity to ultraviolet radiation in an Arabidopsis mutant deficient in flavonoid accumulation. Planta **194**: 504–509.

Lois, R., Dietrich, A., Hahlbrock, K., and Schulz, W. (1989). A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. Embo J 8: 1641–1648.

Lotfy, S., Javelle, F., and Negrel, J. (1995). Distribution of hydroxycinnamoyl-CoA : omaga-hydroxypalmitic acid O-hydroxycinnamoyltransferases in higher plants. phytochemistry **40**: 389–391.

Lu, S., Zhou, Y., Li, L., and Chiang, V.L. (2006). Distinct roles of cinnamate 4-hydroxylase genes in Populus. Plant Cell Physiol 47: 905–914.

Luo, J. et al. (2009). A novel polyamine acyltransferase responsible for the accumulation of spermidine conjugates in Arabidopsis seed. Plant Cell **21**: 318–333.

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.

Ma, H. (2005). Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. Annu Rev Plant Biol **56**: 393–434.

Ma, X., Koepke, J., Panjikar, S., Fritzsch, G., and Stockigt, J. (2005). Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. J Biol Chem 280: 13576–13583.

Mackenzie, A., Heslop-Harrison, J., and Dickinson, H.G. (1967). Elimination of ribosomes during meiotic prophase. Nature **215**: 997–999.

Makaroff, O.a. (1995). Ultrastructure of microsporogenesis and microgametogenesis in Arabidopsis thalianan ecotype Wassilewskija (Brassicaceae). Protoplasma **185**: 7–21.

Martin-Tanguy, J. (1985). The occurence and possible function of hydroxycinnamoyl acid amides in plants. Plant Growth Regul. **3**: 381–399.

Martin-tanguy, J., Cabanne, F., Perdrizet, E., and Martin, C. (1978). The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants. Phytochemistry 17: 1927–1928.

Matsuno, M. et al. (2009). Evolution of a novel phenolic pathway for pollen development. Science **325**: 1688–1692.

Mayama, S., Tani, T., and Matsuraa, Y. (1981). The production of phytoalexins by oat in response to crown rust, Puccina coronata. Physiol Plant Pathol. **19**: 217–226.

Mayfield, J.A., Fiebig, A., Johnstone, S.E., and Preuss, D. (2001). Gene families from the Arabidopsis thaliana pollen coat proteome. Science **292**: 2482–2485.

Mayfield, J.A., and Preuss, D. (2000). Rapid initiation of Arabidopsis pollination requires the oleosin-domain protein GRP17. Nat Cell Biol **2**: 128–130.

Meurer, B., Wiermann, R., and Strack, D. (1988). Phenylpropanoid patterns in Fagales pollen and their phylogenetic relevance. Phytochemistry 27: 823–828.

Meyer, K., Shirley, A.M., Cusumano, J.C., Bell-Lelong, D.A., and Chapple, C. (1998). Lignin monomer composition is determined by the expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A **95**: 6619–6623.

Milkowski, C., and Strack, D. (2004). Serine carboxypeptidase-like acyltransferases. Phytochemistry 65: 517–524.

Mizuuchi, Y., Shimokawa, Y., Wanibuchi, K., Noguchi, H., and Abe, I. (2008). Structure function analysis of novel type III polyketide synthases from Arabidopsis thaliana. Biol Pharm Bull **31**: 2205–2210.

Mo, Y., Nagel, C., and Taylor, L.P. (1992). Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. Proc Natl Acad Sci U S A **89**: 7213–7217.

Molina, I., Beisson-Li, Y., Beisson, F., Ohlrogge, J.B., and Pollard, M. (2009). Identification of an Arabidopsis Feruloyl-CoA Transferase Required for Suberin Synthesis. Plant Physiol

Monties, B. (1989). Lignins. (London: Academic Press).

Morant, M. et al. (2007). CYP703 is an ancient cytochrome P450 in land plants catalyzing in-chain hydroxylation of lauric acid to provide building blocks for sporopollenin synthesis in pollen. Plant Cell **19**: 1473–1487.

Mori, M. et al. (2005). UV-B protective effect of a polyacylated anthocyanin, HBA, in flower petals of the blue morning glory, Ipomoea tricolor cv. Heavenly Blue. Bioorg Med Chem **13**: 2015–2020.

Muroi, **A.** et al. (2009). Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in Arabidopsis thaliana. Planta **230**: 517–527.

Murphy, **D.J.**, and **Ross**, **J.H.** (1998). Biosynthesis, targeting and processing of oleosin-like proteins, which are major pollen coat components in Brassica napus. Plant J **13**: 1–16.

Nair, R.B. et al. (2002). Arabidopsis CYP98A3 mediating aromatic 3-hydroxylation. Developmental regulation of the gene, and expression in yeast. Plant Physiol **130**: 210–220.

Nedelkina, S. et al. (1999). Novel characteristics and regulation of a divergent cinnamate 4-hydroxylase (CYP73A15) from French bean: engineering expression in yeast. Plant Mol Biol **39**: 1079–1090.

Negrel, J., Javelle, F., and Paynot, M. (1993). Biochemical Basis of Resistance of Tobacco Callus Tissue Cultures to Hydroxyphenylethylamines. Plant Physiol **103**: 329–334.

Negrel, J., and Martin, C. (1984). The biosynthesis of feruloyltyramine in Nicotiana tabacum. Phytochemistry 23: 2747–2751.

Ni, W. et al. (1996). Stress Responses in Alfalfa (XXI. Activation of Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase and Caffeoyl Coenzyme A 3-O-Methyltransferase Genes Does Not Contribute to Changes in Metabolite Accumulation in Elicitor-Treated Cell-Suspension Cultures). Plant Physiol **112**: 717–726.

Niemann, G.J. (1993). The anthranilamide phytoalexins of the Caryophylaceae and related compounds. Phytochemistry **34**: 319–328.

Paxson-Sowders (1997). A comparative ultrastructural analysis of exine pattern development in wild-typeArabidopsis and a mutant defective in pattern formation. Protoplasma **198**: 53–65.

Peer, W.A. et al. (2001). Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of arabidopsis. Plant Physiol **126**: 536–548.

Peipp, H., Walter, M., Schmidt, J., Wray, V., and Strack, D. (1997). Arbuscular mycorrhizal fungus-induced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots. Phytochemistry **44**: 581–587.

Petersen, M., Strack, D., and Matern, U. (1999). Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds. Sheffield Acad. Press Ltd).

Pichersky, E., and Niyogi, K. (2006). Physiology and metabolism: the second coming of plant biochemistry and physiology. Curr Opin Plant Biol **9**: 217–219.

Piffanelli, P., Ross, J.H., and Murphy, D.J. (1997). Intra- and extracellular lipid composition and associated gene expression patterns during pollen development in Brassica napus. Plant J **11**: 549–562.

Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., and Ohlrogge, J.B. (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. Trends Plant Sci **13**: 236–246.

Ponchet, M., Martin-Tanguy, J., Marai, A., and Martin, C. (1982). Hydroxycinnamoyl acid amides and aromatic amines in the inflorescence of some Araceae species. Phytochemistry **21**: 2865–2869.

Preuss, D., Lemieux, B., Yen, G., and Davis, R.W. (1993). A conditional sterile mutation eliminates surface components from Arabidopsis pollen and disrupts cell signaling during fertilization. Genes Dev **7**: 974–985.

Pruitt, R.E., Vielle-Calzada, J.P., Ploense, S.E., Grossniklaus, U., and Lolle, S.J. (2000). FIDDLEHEAD, a gene required to suppress epidermal cell interactions in Arabidopsis, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 1311–1316.

Raes, J., Rohde, A., Christensen, J.H., Van de Peer, Y., and Boerjan, W. (2003). Genome-wide characterization of the lignification toolbox in Arabidopsis. Plant Physiol **133**: 1051–1071.

Raiber, S., Schroder, G., and Schroder, J. (1995). Molecular and enzymatic characterization of two stilbene synthases from Eastern white pine (Pinus strobus). A single Arg/His difference determines the activity and the pH dependence of the enzymes. FEBS Lett **361**: 299–302.

Reddy, M.S. et al. (2005). Targeted down-regulation of cytochrome P450 enzymes for forage quality improvement in alfalfa (Medicago sativa L.). Proc Natl Acad Sci U S A **102**: 16573–16578.

Rohde, A. et al. (2004). Molecular phenotyping of the pall and pal2 mutants of Arabidopsis thaliana reveals farreaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. Plant Cell **16**: 2749– 2771. **Ross, J.H., and Murphy, D.J.** (1996). Characterization of anther-expressed genes encoding a major class of extracellular oleosin-like proteins in the pollen coat of Brassicaceae. Plant J **9**: 625–637.

Rozema, J., Blokker, P., Mayoral Fuertes, M.A., and Broekman, R. (2009). UV-B absorbing compounds in present-day and fossil pollen, spores, cuticles, seed coats and wood: evaluation of a proxy for solar UV radiation. Photochem Photobiol Sci 8: 1233–1243.

Rozema, J. et al. (2001). UV-B absorbance and UV-B absorbing compounds (para-coumaric acid) in pollen and sporopollenin: the perspective to track historic UV-B levels. J Photochem Photobiol B **62**: 108–117.

Rubin-Pitel, S.B. et al. (2008). Distinct structural elements dictate the specificity of the type III pentaketide synthase from Neurospora crassa. Chem Biol **15**: 1079–1090.

Ruegger, M., and Chapple, C. (2001). Mutations that reduce sinapoylmalate accumulation in Arabidopsis thaliana define loci with diverse roles in phenylpropanoid metabolism. Genetics **159**: 1741–1749.

Ruiter, R.K., van Eldik, G.J., van Herpen, M.M., Schrauwen, J.A., and Wullems, G.J. (1997a). Expression in anthers of two genes encoding Brassica oleracea transmembrane channel proteins. Plant Mol Biol **34**: 163–168.

Ruiter, R.K., Van Eldik, G.J., Van Herpen, R.M., Schrauwen, J.A., and Wullems, G.J. (1997b). Characterization of oleosins in the pollen coat of Brassica oleracea. Plant Cell **9**: 1621–1631.

Ryan, K.G., Swinny, E.E., Winefield, C., and Markham, K.R. (2001). Flavonoids and UV photoprotection in Arabidopsis mutants. Z Naturforsch [C] 56: 745–754.

Saarinen, N.M., Penttinen, P.E., Smeds, A.I., Hurmerinta, T.T., and Makela, S.I. (2005). Structural determinants of plant lignans for growth of mammary tumors and hormonal responses in vivo. J Steroid Biochem Mol Biol **93**: 209–219.

S., S., ZW., S., B., D.-N., and M.H., Z. (1998). The biosynthesis of lunarine in seeds of Lunaria annua. Phytochemistry 47: 375–387.

Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001). Molecular cloning, a laboratory manual. (New-York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sanders, P.M. (1999). Anther developmental defects in Arabidopsis thaliana male-sterile mutants. Sexual Plant Reproduction **11**: 297–322.

Saxena, P., Yadav, G., Mohanty, D., and Gokhale, R.S. (2003). A new family of type III polyketide synthases in Mycobacterium tuberculosis. J Biol Chem 278: 44780–44790.

Schanz, S., Schroder, G., and Schroder, J. (1992). Stilbene synthase from Scots pine (Pinus sylvestris). FEBS Lett **313**: 71–74.

Schmelzer, E., Jahnen, W., and Hahlbrock, K. (1988). In situ localization of light-induced chalcone synthase mRNA, chalcone synthase, and flavonoid end products in epidermal cells of parsley leaves. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 2989–2993.

Schmidt, A. et al. (1999). Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoyl-

CoA:tyramine N-(hydroxycinnamoyl)transferase. J Biol Chem 274: 4273-4280.

Schmidt, A., Scheel, D., and Strack, D. (1998). Elicitor-stimulated biosynthesis of

hydroxycinnamoyltyramines in cell suspension cultures of Solanum tuberosum. Planta 205: 201-205.

Schoch, G. et al. (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.

Schroder, G., Brown, J.W., and Schroder, J. (1988). Molecular analysis of resveratrol synthase. cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase. Eur J Biochem **172**: 161–169.

Sederoff, R.R., MacKay, J.J., Ralph, J., and Hatfield, R.D. (1999). Unexpected variation in lignin. Curr Opin Plant Biol 2: 145–152.

Shadle, G. et al. (2007). Down-regulation of hydroxycinnamoyl CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase in transgenic alfalfa affects lignification, development and forage quality. Phytochemistry **68**: 1521–1529.

Shalit, M. et al. (2003). Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A.

Geraniol/Citronellol acetyltransferase in developing rose petals. Plant Physiol 131: 1868–1876.

Shirley, B.W. et al. (1995). Analysis of Arabidopsis mutants deficient in flavonoid biosynthesis. Plant J **8**: 659–671.

Smeds, A.I., Jauhiainen, L., Tuomola, E., and Peltonen-Sainio, P. (2009). Characterization of variation in the lignan content and composition of winter rye, spring wheat, and spring oat. J Agric Food Chem 57: 5837–5842. Sorensen, A.M. et al. (2003). The Arabidopsis ABORTED MICROSPORES (AMS) gene encodes a MYC class transcription factor. Plant J 33: 413–423.

Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G., and Tonelli, C. (1994). Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (Vitis vinifera L.). Plant Mol Biol **24**: 743–755.

Srinivasa Reddy, M.S. et al. (2005). Targeted down-regulation of cytochrome P450 enzymes for storage quality improvement in alfalfa. PNAS **102**: 16573–16578.

St-Pierre, B., and De Luca, V. (2000). Evolution of acyltransferases genes: origin and diversification of the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. Rec. Adv. Phytochem. **34**: 285–315.

St-Pierre, B., Laflamme, P., Alarco, A.M., and De Luca, V. (1998). The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. Plant J **14**: 703–713.

Strack, D., Eilert, U., Wray, V., Wolff, J., and Jaggy, H. (1990). Tricoumaroylspermidine in flowers of Rosaceae. Phytochemistry **29**: 2893–2896.

Suen, D.F., Wu, S.S., Chang, H.C., Dhugga, K.S., and Huang, A.H. (2003). Cell wall reactive proteins in the coat and wall of maize pollen: potential role in pollen tube growth on the stigma and through the style. J Biol Chem 278: 43672–43681.

Suzuki, H. et al. (2004). Identification and characterization of a novel anthocyanin malonyltransferase from scarlet sage (Salvia splendens) flowers: an enzyme that is phylogenetically separated from other anthocyanin acyltransferases. Plant J **38**: 994–1003.

Suzuki, T., Masaoka, K., Nishi, M., Nakamura, K., and Ishiguro, S. (2008). Identification of kaonashi mutants showing abnormal pollen exine structure in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol 49: 1465–1477.
Tacke, E. et al. (1995). Transposon tagging of the maize Glossy2 locus with the transposable element En/Spm. Plant J 8: 907–917.

Taguchi, G., Shitchi, Y., Shirasawa, S., Yamamoto, H., and Hayashida, N. (2005). Molecular cloning, characterization, and downregulation of an acyltransferase that catalyzes the malonylation of flavonoid and naphthol glucosides in tobacco cells. Plant J **42**: 481–491.

Tang, L.K., Chu, H., Yip, W.K., Yeung, E.C., and Lo, C. (2009). An anther-specific dihydroflavonol 4-reductase-like gene (DRL1) is essential for male fertility in Arabidopsis. New Phytol **181**: 576–587.

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.

Unno, H. et al. (2007). Structural and mutational studies of anthocyanin malonyltransferases establish the features of BAHD enzyme catalysis. J Biol Chem

Van der Meer, I.M., Stam, M.E., van Tunen, A.J., Mol, J.N., and Stuitje, A.R. (1992). Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. Plant Cell 4: 253–262.

Vizcay-Barrena, G., and Wilson, Z.A. (2006). Altered tapetal PCD and pollen wall development in the Arabidopsis ms1 mutant. J Exp Bot **57**: 2709–2717.

Von Roepenack-Lahaye, E. et al. (2003). p-Coumaroylnoradrenaline, a novel plant metabolite implicated in tomato defense against pathogens. J Biol Chem **278**: 43373–43383.

von Ropenack, E., Parr, A., and Schulze-Lefert, P. (1998). Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. J Biol Chem **273**: 9013–9022.

Wagner, A. et al. (2007). Exploring lignification in conifers by silencing hydroxycinnamoyl-CoA:shikimate hydroxycinnamoyltransferase in Pinus radiata. Proc Natl Acad Sci U S A **104**: 11856–11861.

Walden, A.R., Walter, C., and Gardner, R.C. (1999). Genes expressed in Pinus radiata male cones include homologs to anther-specific and pathogenesis response genes. Plant Physiol **121**: 1103–1116.

Walker, K., and Croteau, R. (2000a). Molecular cloning of a 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from Taxus and functional expression in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 583–587.

Walker, K., and Croteau, R. (2000b). Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA:taxane 2alpha-O-benzoyltransferase cDNA from taxus and functional expression in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 13591–13596.

Walker, K., Fujisaki, S., Long, R., and Croteau, R. (2002a). Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in Taxol biosynthesis. Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 12715–12720.

Walker, K., Long, R., and Croteau, R. (2002b). The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from Taxus. Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 9166–9171.

Walker, K., Schoendorf, A., and Croteau, R. (2000). Molecular cloning of a taxa-4(20),11(12)-dien-5alpha-ol-O-acetyl transferase cDNA from Taxus and functional expression in Escherichia coli. Arch Biochem Biophys 374: 371–380.

Waters, E.R. (2003). Molecular adaptation and the origin of land plants. Mol Phylogenet Evol 29: 456–463.
Watson, J.S. et al. (2007). Rapid determination of spore chemistry using thermochemolysis gas chromatography-mass spectrometry and micro-Fourier transform infrared spectroscopy. Photochem Photobiol Sci 6: 689–694.

Wei, Neergaard, d., Thordal-Christensen, Collinge, Smedegaard-Petersen (1994). Accumulation of a putative guanidine compound in relation to other early defence reactions in epidermal cells of barley and wheat exhibiting resistance to Erysiphe graminis f.sp. hordei. Physiological and Molecular Plant Pathology 45: 469–484.

Weiss, M.R. (1991). Floral color changes as cues for pollenators. Nature 354: 227-229.

Wellmer, F., Riechmann, J.L., Alves-Ferreira, M., and Meyerowitz, E.M. (2004). Genome-wide analysis of spatial gene expression in Arabidopsis flowers. Plant Cell **16**: 1314–1326.

Willson, M.F., and Whelen, C.J. (1990). The evolution of fruit color in flesby-fruited plants. Am. Nat. 136: 790–809.

Wilson, Z.A., Morroll, S.M., Dawson, J., Swarup, R., and Tighe, P.J. (2001). The Arabidopsis MALE STERILITY1 (MS1) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors. Plant J **28**: 27–39.

Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry **64**: 3–19.

Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. Plant Physiol **126**: 485–493.

Winter, D. et al. (2007). An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. PLoS One 2: e718.

Wu, S. et al. (2008). A chalcone synthase-like gene is highly expressed in the tapetum of both wheat (Triticum aestivum L.) and triticale (xTriticosecale Wittmack). Plant Cell Rep **27**: 1441–1449.

Xia, Y., Nikolau, B.J., and Schnable, P.S. (1996). Cloning and characterization of CER2, an Arabidopsis gene that affects cuticular wax accumulation. Plant Cell 8: 1291–1304.

Yamauchi, K., Yasuda, S., Hamada, K., Tsutsumi, Y., and Fukushima, K. (2003). Multiform biosynthetic pathway of syringyl lignin in angiosperms. Planta **216**: 496–501.

Yang, C., Vizcay-Barrena, G., Conner, K., and Wilson, Z.A. (2007). MALE STERILITY1 is required for tapetal development and pollen wall biosynthesis. Plant Cell **19**: 3530–3548.

Yang, Q., Reinhard, K., Schiltz, E., and Matern, U. (1997). Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA:anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, Dianthus caryophyllus L. Plant Mol Biol **35**: 777–789.

Yang, Q. et al. (2004). Analysis of the involvement of hydroxyanthranilate hydroxycinnamoyltransferase and caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase in phytoalexin biosynthesis in oat. Mol Plant Microbe Interact **17**: 81–89.

Yau, C.P., Zhuang, C.X., Zee, S.Y., and Yip, W.K. (2005). Expression of a microsporocyte-specific gene encoding dihydroflavonol 4-reductase-like protein is developmentally regulated during early microsporogenesis in rice. Sex. Plant Reprod. 18:

Ylstra, B., Busscher, J., Franken, J., and Hollman, P.C.H. (1994). Flavonols and fertilization in Petunia hybrida: localisation and mode of action during pollen tube growth. Plant Journal **6**: 201–212.

Ylstra, B., Muskens, M., and Van Tunen, A.J. (1996). Flavonols are not essential for fertilization in Arabidopsis thaliana. Plant Mol Biol **32**: 1155–1158.

Yu, C.K. et al. (2005). A stilbene synthase gene (SbSTS1) is involved in host and nonhost defense responses in sorghum. Plant Physiol **138**: 393–401.

Yu, M., and Facchini, P.J. (1999). Purification, characterization, and immunolocalization of hydroxycinnamoyl-CoA: tyramine N-(hydroxycinnamoyl)transferase from opium poppy. Planta 209: 33–44.
Yu, X.H., Gou, J.Y., and Liu, C.J. (2009). BAHD superfamily of acyl-CoA dependent acyltransferases in Populus and Arabidopsis: bioinformatics and gene expression. Plant Mol Biol 70: 421–442.

Zacares, L. et al. (2007). Induction of p-coumaroyldopamine and feruloyldopamine, two novel metabolites, in tomato by the bacterial pathogen Pseudomonas syringae. Mol Plant Microbe Interact **20**: 1439–1448.

Zhang, Z.B. et al. (2007). Transcription factor AtMYB103 is required for anther development by regulating

tapetum development, callose dissolution and exine formation in Arabidopsis. Plant J 52: 528-538.

Zheng, Z., Qualley, A., Fan, B., Dudareva, N., and Chen, Z. (2009). An important role of a BAHD acyl transferase-like protein in plant innate immunity. Plant J 57: 1040–1053.

Zinkl, G.M., Zwiebel, B.I., Grier, D.G., and Preuss, D. (1999). Pollen-stigma adhesion in Arabidopsis: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. Development **126**: 5431–5440.

Résumé :

La paroi et le manteau du pollen des plantes supérieures se caractérisent par le haut degré de résistance qu'ils confèrent au grain de pollen. Ces fonctions reposent largement sur la synthèse de composés spécifiques dérivant du métabolisme secondaire. Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé une nouvelle acyltransférase d'*Arabidopsis thaliana*, la Spermidine Hydroxycinnamoyl Transférase (*SHT*), impliquée dans la synthèse de phénolamides constitutives du manteau pollinique. Nous avons montré que *SHT* est spécifiquement exprimée dans les cellules du tapétum de l'anthère, et que son expression est corrélée à l'accumulation d'hydroxycinnamoyl spermidines au niveau du manteau pollinique. Nous avons démontré que la protéine recombinante catalyse *in vitro* ce type de composé, par le transfert d'acides hydroxycinnamiques sur les fonctions amines de la spermidine. L'analyse du mutant KO *sht* révèle des malformations du grain de pollen, ce qui montre l'implication du gène dans son développement. Enfin, par l'analyse de lignées silencées et par l'étude de l'activité de la protéine recombinante, nous avons identifié une *CCoAOMT-like* corégulée avec *SHT* qui intervient dans le même métabolisme, en méthylant le conjugué de spermidine *in planta*.

Par une analyse de corégulation, nous avons sélectionné deux Polykétide Synthases (*PKS-A* et *PKS-B*) et deux Tétrakétide α -Pyrone Réductases (*TPR1* et *TPR2*) d'Arabidopsis thaliana, fortement coexprimées avec des gènes intervenant dans la synthèse de la paroi du pollen. Une expression spécifique du tapétum a été démontrée, et l'activité enzymatique des protéines recombinantes étudiée *in vitro*. Les deux PKS catalysent la condensation de 2 ou 3 molécules de malonyl-CoA sur différents esters de CoA d'acide gras pour former les tri et tétrakétide α -pyrones correspondants. Nous avons montré que le tétraketide produit par les PKS, pouvait être substrat de TPR-1 et -2, qui réduisaient *in vitro* la fonction cétone en alcool secondaire. L'analyse des mutants KO *pks-a* et *pks-b* a permis de mettre en évidence des réductions importantes des dépôts de l'exine dans la paroi du pollen, alors que le double mutant *pks-a/pks-b* ne produit plus de pollen. Le mutant *tpr1* est également caractérisé par une absence de pollen mature, alors que le mutant *tpr2* est fertile et ne présente que de légers défauts de sa paroi pollinique. Enfin, par des analyses phylogénétiques, nous avons montré la conservation de cest gènes chez la majorité des plantes terrestres, y compris la mousse *Physcomitrella*, révélant ainsi l'ancienneté et la conservation de cette voie métabolique, qui conduit à la synthèse de la sporopollénine.

Abstract :

Pollen wall and coat are caracterized by a high degree of resistance to various stress, largely through the synthesis of secondary metabolite precursors. We caracterized the Spermidine Hydroxycinnamoyl Transferase (SHT), a new *Arabidopsis* BAHD acyltransferase, which is involved in the synthesis of a dihydroxyferuloyl-monosinapoyl spermidine phenolamide. We showed the specific expression of *SHT* in anther tapetal cells, and we investigated the *in vitro* activity of the recombinant protein. SHT is able to transfer an hydroxycinnamoyl moiety to each of the 3 amine fonctions of spermidine. The analysis of *sht* KO mutant revealed irregularities and depressions of the pollen wall, indicating the involvement of *SHT* gene in pollen development. Finally, a methyltransferase gene which is co-regulated with *SHT* during flower development, was shown to be involved in the O-methylation of spermidine conjugates by analyzing the consequences of its repression in RNAi plants and by characterizing the methylation activity of the recombinant enzyme.

By *in silico* co-regulation analysis, we selected two Polyketide Sythases (*PKS-A* and *PKS-B*) and two Tetraketide α -pyrone Reductases (*TPR1* and *TPR2*) tightly co-expressed with genes involved in pollen wall synthesis. The four genes were shown to be specifically expressed in tapetal cells, and the enzyme activity of each protein was determined *in vitro*. The two PKS recombinant proteins catalysed the condensation of 2 or 3 malonyl-CoA with various fatty acid CoA ester, producing the corresponding tri and tetraketide. The tetraketides produced by PKS were shown to be substrates of the two TPR, that reduced the cetone function to a secondary alcohol. Analysis of *pks-a* and *pks-b* KO mutants revealed severe reduction of exine deposition on their pollen wall, while *pks-a/pks-b* is unable to produce mature pollen. The *tpr1* mutant was also male sterile while *tpr2* mutant exhibited subtle changes on its pollen wall. Finally, by phylogenetic analysis, we showed the conservation of the genes involved in the biosynthesis pathway, from mosses to higher plants.